



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**TESIS DOCTORAL**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 POR  
CALCIO EN MACRÓFAGOS Y ANÁLISIS DE SU PAPEL EN EL  
DESARROLLO DE ATROSCLEROSIS**

**M<sup>a</sup> Gema Marín Alberca**

Madrid, Mayo de 2013



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA- 2 POR CALCIO  
EN MACRÓFAGOS Y ANÁLISIS DE SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE  
ATEROSCLEROSIS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares por:

**M<sup>a</sup> Gema Marín Alberca**

Directores de tesis:

**Manuel Fresno Escudero**  
**Miguel Ángel Íñiguez Peña**

Madrid, Junio 2013



Departamento de Biología Molecular

**D. Manuel Fresno Escudero, Catedrático de Microbiología y Miguel Ángel Íñiguez Peña, Profesor Titular de Bioquímica, ambos pertenecientes al Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid,**

**CERTIFICAN**

Que **Dña. M<sup>a</sup> Gema Marín Alberca**, Licenciada en Biología y Máster en Biotecnología y Biomedicina por la Universidad de Alicante, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: ***Regulación de la expresión de la ciclooxigenasa-2 por calcio en macrófagos y análisis de su papel en el desarrollo de aterosclerosis.***

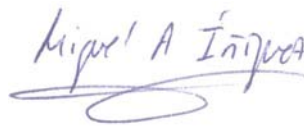
Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares.

En Madrid, a 29 de mayo de 2013



Dr. Manuel Fresno Escudero

Catedrático de la UAM



Dr. Miguel Ángel Íñiguez

Profesor Titular de la UAM



---

**M<sup>a</sup> Gema Marín Alberca** ha disfrutado de una beca FPI asociada al proyecto SAF2007-61716.

*Este trabajo de Tesis ha sido financiado por las ayudas a los proyectos SAF2007-61716, SAF2010-18733, RED RECAVA RD06/0014/1013 y RED RICET RD06/0021/0016, concedidas por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y el Instituto de Salud “Carlos III” al Dr. Manuel Fresno y por los proyectos BFU2007-62659/BMC, BFU2010-21055, SAF2011-23971 y CCG08-UAM/BIO-4299, otorgados por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), MICINN, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y Comunidad Autónoma de Madrid – Universidad Autónoma de Madrid (CAM-UAM), respectivamente, al Dr. Miguel Ángel Íñiguez.*

---





*A mis padres,*

*a la vida.*

*“El secreto de la felicidad no está en hacer siempre  
lo que se quiere, sino en querer siempre lo que se  
hace”*

L. Tolstoy



## **AGRADECIMIENTOS**

*“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que  
hay que decir desborda el alma”*

J. Cortázar



## ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT / RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I. MACRÓFAGOS E INFLAMACIÓN.</b>	<b>9</b>
1. Expresión de genes en macrófagos activados.	9
1.1. Activación de macrófagos por LPS.	10
1.2. El calcio en la activación de células del sistema inmune.	11
<b>II. COX-2 Y PROSTANOIDES COMO MEDIADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.</b>	<b>15</b>
1. Síntesis de prostanoïdes.	16
1.1 Ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2).	17
1.2 Acciones de los prostanoïdes en la inflamación.	19
<b>III. ATROSCLOEROSIS Y PROSTANOïDES.</b>	<b>20</b>
1. Papel del colesterol en la aterosclerosis.	21
2. Macrófagos e inflamación en el desarrollo de aterosclerosis.	22
2.1. Formación de células espumosas y regulación del flujo de colesterol en el macrófago.	23
3. Acciones de los prostanoïdes en la aterosclerosis.	26
3.1. Papel de COX-2 en la aterosclerosis.	28
<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>I. MATERIALES</b>	<b>33</b>
1. Modelos animales.	33
2. Cultivos celulares.	35
3. Soluciones, anticuerpos y reactivos.	37
4. Oligonucleótidos.	41
5. Plásmidos.	42

<b>II. MÉTODOS</b>	<b>43</b>
1. Transfección transitoria y actividad luciferasa.	43
2. Análisis de la expresión génica mediante <i>RT-PCR</i> .	44
3. Inmunodetección de proteínas ( <i>Western Blot</i> ).	45
4. Obtención de extractos citosólicos y nucleares.	45
5. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).	46
6. Análisis de la movilización de calcio intracelular.	46
7. Inmunofluorescencia.	47
8. Medición de prostaglandinas.	47
9. Generación de aterosclerosis.	48
10. Análisis de las lesiones ateromatosas en la aorta.	49
11. Inmunohistoquímica.	50
12. Ensayo de captación de LDL acetiladas (acLDL).	50
13. Generación de células espumosas.	51
14. Ensayo de medida de flujo de colesterol.	51
15. Medición de colesterol, triglicéridos y citoquinas en suero.	52
16. Análisis estadístico.	52

## RESULTADOS

<b>I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR CALCIO EN MACRÓFAGOS.</b>	<b>54</b>
1. El incremento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular induce la expresión de COX-2 en macrófagos.	54
2. Regulación de la expresión de COX-2 en respuesta a ligandos de GPCRs acoplados a proteína $\text{G}\alpha\text{q}$ .	70
3. El $\text{Ca}^{2+}$ regula la expresión de múltiples genes en macrófagos.	73
<b>II. PAPEL DE COX-2 EN ATEROSCLEROSIS. EFECTO DE LA AUSENCIA DE COX-2 EN EL TRANSPORTE DEL COLESTEROL EN MACRÓFAGOS.</b>	<b>79</b>
1. Generación y caracterización de ratones <i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i> .	79
2. Estudio de las lesiones de ateroma en ratones <i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i> .	80
3. Estudio de parámetros inflamatorios en los ratones <i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i> .	84
4. Análisis del metabolismo y transporte de lípidos en ratones <i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i> .	87

5. Implicación de COX-2 en el transporte de lípidos en macrófagos.	93
--	----

## DISCUSIÓN

<b>I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR CALCIO EN MACRÓFAGOS.</b>	<b>101</b>
---	------------

1. Efecto del calcio y el LPS en la regulación de COX-2.	101
2. La vía de señalización de $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurina/NFAT en la inducción de la expresión génica en macrófagos.	102
3. Regulación de la expresión de COX-2 en respuesta a ligandos de GPCRs acoplados a $\text{G}\alpha_q$ .	105

<b>II. PAPEL DE COX-2 EN LA ATEROSCLEROSIS. IMPACTO DE LA AUSENCIA DE COX-2 EN EL TRANSPORTE DEL COLESTEROL EN MACRÓFAGOS.</b>	<b>107</b>
--	------------

1. Desarrollo de aterosclerosis en ratones <i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i> .	108
2. Efecto de COX-2 en la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en macrófagos.	111

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>115</b>
---------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117</b>
---------------------	------------

<b>Material Suplementario</b>	<b>118</b>
-------------------------------	------------



## ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

<b>15d-PGJ<sub>2</sub></b>	15-desoxi- $\Delta^{12, 14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub>
<b>18S</b>	Subunidad 18S de ARN ribosómico
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ABCA1</b>	Transportador <i>ATP-binding cassette</i> A1
<b>ABCG1</b>	Transportador <i>ATP-binding cassette</i> G1
<b>acLDL</b>	Lipoproteína de Baja Densidad acetilada
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario
<b>AINE</b>	Anti-Inflamatorio No Esteroideo
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>apoA-I</b>	Apolipoproteína A-I
<b>apoE</b>	Apolipoproteína E
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CCR</b>	Receptor de quimioquinas
<b>CD11c</b>	Integrina alpha X
<b>Celec</b>	Celecoxib
<b>Cn</b>	Calcineurina
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CRAC</b>	Canal activado por calcio liberador de calcio
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>DAG</b>	Diacylglicerol
<b>dbAMPc</b>	Dibutiril-adenosín monofosfato cíclico
<b>DP</b>	Receptor de PGD <sub>2</sub>
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
<b>End I</b>	Endotelina I
<b>EP</b>	Receptor de PGE <sub>2</sub>
<b>FITC</b>	Fluoresceína isotiocianato
<b>FP</b>	Receptor de FP
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad

<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico inducible
<b>Io</b>	Ionomicina
<b>Ion</b>	Ionóforo de calcio A23187
<b>IP</b>	Receptor de PGI <sub>2</sub>
<b>IP3</b>	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
<b>IκB</b>	Inhibidor de NF-κB
<b>IκK</b>	Quinasa de IκB
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LDLr</b>	Receptor de LDL
<b>LPDS</b>	Prostaglandina D Sintasa lipocalina
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LXR</b>	Receptor X hepático
<b>MAPK</b>	Quinasas activadas por mitógenos
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de matriz
<b>mPGES-1</b>	Prostaglandina E Sintasa microsomal 1
<b>NFAT</b>	Factor Nuclear de células T activadas
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear kappa B
<b>ORO</b>	Oil Red O
<b>oxLDL</b>	Lipoproteína de Baja Densidad oxidada
<b>O.D</b>	Densidad óptica
<b>PBS</b>	Solución de tampón salino fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGIS</b>	Prostaglandina I Sintasa
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMA</b>	Éster de forbol mirastato
<b>PPAR</b>	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
<b>PSL</b>	Luminiscencia fotoestimulada
<b>RLU</b>	Unidad Relativa de Luminiscencia
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>SD</b>	Desviación estándar

<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SR-A</b>	Receptor <i>Scavenger A</i>
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>TLR</b>	Receptor <i>Toll Like</i>
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TP</b>	Receptor de TX
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>TXAS</b>	Tromboxano A Sintasa
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión de células vasculares 1
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad

## ***ABSTRACT/RESUMEN***



Macrophages play a key role in the inflammatory response upon activation by various signals including pathogens, cytokines, chemokines and others mediators. Once activated, macrophages induce the expression of bioactive molecules such as cytokines, chemokines, proteases and enzymes synthesizing inflammatory mediators as cyclooxygenase 2 (COX-2). This enzyme is responsible for the exacerbated production of prostanoids in inflammatory processes. In response to stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), there is an induction of COX-2 and mPGES-1 synthase expression that results in an increased production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), which has an essential role in the inflammatory process. In the first part, this thesis analyzes the effect of stimuli that promote an increase of intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>), as the ionophore A23187 (Ion), on the regulation of COX-2 expression. The results obtained in murine (RAW 264.7) or human (THP-1) monocyte/macrophage cell lines, as well as in mouse peritoneal macrophages show that elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> leads to an increase in the expression of COX-2, and other genes with an important role in inflammation, including mPGES-1, iNOS and IL-6. The Ca<sup>2+</sup> signaling cooperates with the activation produced by LPS on the induction of COX-2 and, consequently, on the production of PGE<sub>2</sub>. The detailed study of Ca<sup>2+</sup>-inducing effect on the expression of these genes in macrophages, revealed the involvement of calcineurin and the activation of nuclear transcription factor of activated T cells (NFAT).

In a second part, we study the role of COX-2 in atherosclerosis. Prostanoids play an important role in cardiovascular pathophysiology and several studies have shown increased expression of COX-2 in atherosclerotic lesions, supporting a proatherosclerotic effect of COX-2. On the other hand, treatment with selective COX-2 inhibitors increases the risk of cardiovascular events. In addition, there are studies that suggest an antiatherosclerotic role of COX-2. Therefore, the study of the actions of COX-2 in atherosclerosis is still of great interest. In order to clarify the role of COX-2 in the atherosclerosis process, we generated *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* mice. The study of the development of atherosclerotic plaques in these mice subjected to a hypercholesterolemic diet, showed a decrease in the size and complexity of atherosclerotic lesions compared to *Cox2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* mice, supporting a proatherosclerotic role of COX-2. Moreover, the study of the lipid profile in these mice showed a decrease in triglycerides and total cholesterol serum levels in the absence of COX-2, with an increase in HDL levels, which is accompanied by an increase in macrophage cholesterol efflux. These data point to a role for COX-2 in the control of cholesterol transport during atherosclerosis.

Los macrófagos juegan un papel esencial en la respuesta inflamatoria tras su activación por distintas señales que incluyen patógenos, citoquinas y quimioquinas entre otros. Una vez activados, los macrófagos inducen la expresión de moléculas bioactivas como citoquinas, quimioquinas, proteasas y enzimas que sintetizan mediadores inflamatorios, como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), responsable de la producción exacerbada de prostanooides en procesos inflamatorios. En respuesta a estímulos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), se produce una inducción de la expresión de la COX-2 y de la sintasa mPGES-1, y por tanto, un incremento en la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que tiene un papel esencial en el proceso inflamatorio. En una primera parte, esta tesis analiza el efecto de estímulos que incrementan los niveles de calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular, como el ionóforo A23187, sobre la regulación de la expresión de COX-2. Los resultados obtenidos en líneas celulares tipo monocito/macrófago de ratón (RAW 264.7) y de humano (THP-1), así como en macrófagos peritoneales de ratón, demuestran que una elevación de Ca<sup>2+</sup> intracelular produce un incremento en la expresión de COX-2, además de otros genes con un papel relevante en la inflamación, incluyendo la mPGES-1, la iNOS y la IL-6. La señalización por Ca<sup>2+</sup> coopera con la activación producida por el LPS sobre la inducción de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub>. Estos resultados ponen de manifiesto la participación de la calcineurina y la activación del factor de transcripción NFAT.

En una segunda parte, se estudia el papel de la COX-2 en la aterosclerosis. Los prostanooides juegan un importante papel en la fisiopatología cardiovascular y diferentes estudios han puesto de manifiesto la sobreexpresión de COX-2 en las lesiones ateroscleróticas, apoyando un efecto proaterosclerótico de COX-2. Por otro lado, el tratamiento con inhibidores selectivos de COX-2 incrementa el riesgo de padecer eventos cardiovasculares adversos, a la vez que existen trabajos que sugieren un papel antiaterosclerótico de la COX-2. Por ello, el estudio de las acciones de COX-2 en la aterosclerosis sigue siendo de gran interés. Con el fin de esclarecer el papel de esta enzima en el proceso aterosclerótico, hemos generado ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*. El estudio de la formación de las placas de ateroma en estos ratones sometidos a una dieta hipercolesterolémica, puso de manifiesto una disminución en el tamaño y complejidad de las lesiones en comparación con ratones *Cox2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, apoyando un papel proaterosclerótico de COX-2. Por otra parte, el estudio del perfil lipídico en estos ratones mostró una disminución de los niveles séricos de triglicéridos y colesterol total en ausencia de COX-2, con un aumento en los niveles de HDL, acompañado de un aumento en el flujo reverso del colesterol en macrófagos deficientes en COX-2. Estos datos apuntan así, a un posible papel de COX-2 en el control del transporte de colesterol en la aterosclerosis.

## INTRODUCCIÓN





## **I. MACRÓFAGOS E INFLAMACIÓN.**

La inflamación es un proceso fisiológico implicado en la eliminación de patógenos o diversos agentes dañinos, y de la restauración de la estructura y funciones tisulares. Sin embargo, en ocasiones la inflamación persiste y se vuelve crónica, o incluso, se producen respuestas inmunes desproporcionadas debido a una modulación deficiente. De este modo, la regulación de este proceso juega un papel importante en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, como pueden ser la aterosclerosis, la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Aoki y Narumiya, 2012).

Los macrófagos son una de las células clave en la respuesta inflamatoria. En la inflamación, los macrófagos tienen tres funciones principales: la presentación de antígenos, la fagocitosis, y la inmunomodulación, mediante la producción de varias citoquinas y factores de crecimiento. Los macrófagos juegan un papel crítico en la iniciación, mantenimiento y resolución de la inflamación tras su activación por distintas señales que incluyen citoquinas (IFN $\gamma$ -interferón gamma, TNF-factor de necrosis tumoral o GM-CSF-factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos), patógenos o sustancias asociadas como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), proteínas de matriz extracelular, complejos inmunes y otros mediadores. Por otro lado, la activación de los macrófagos inflamatorios puede ser inhibida por citoquinas como la interleuquina (IL)-10 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) (Mosser, 2003; Nathan, 1991).

### **1. Expresión de genes en macrófagos activados.**

La activación de los macrófagos implica la síntesis y secreción de diversas moléculas que participan de forma activa en el proceso inflamatorio. En conjunto, estos factores, bien de forma directa, o a través de la inducción a su vez de la producción y liberación de nuevos mediadores inflamatorios, promueven el reclutamiento de células del sistema inmune al foco inflamatorio y su activación, con el objetivo final de eliminar el agente causal y favorecer la regeneración del tejido dañado. Aunque los procesos inflamatorios se desencadenan de cara a la resolución de infecciones o agresiones que causan daño tisular, la inflamación prolongada puede producir o amplificar diversas situaciones patológicas. Por este motivo los genes implicados en procesos inflamatorios se expresan bajo una fina regulación que evita respuestas inmunes desproporcionadas o dañinas.

Entre los principales factores producidos por los macrófagos activados se encuentran citoquinas como IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ; quimioquinas como MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), proteasas y enzimas que sintetizan mediadores inflamatorios, entre ellas la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), responsable de la producción de NO, o la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la sintasa de PGE<sub>2</sub> microsomal 1 (mPGES-1) que participan en la producción de prostaglandinas (Cassetta *et al.*, 2011; Ortega-Gómez *et al.*, 2013). Estos factores se sintetizan tras la activación de diferentes vías de señalización que, en general, conducen a la inducción en su expresión.

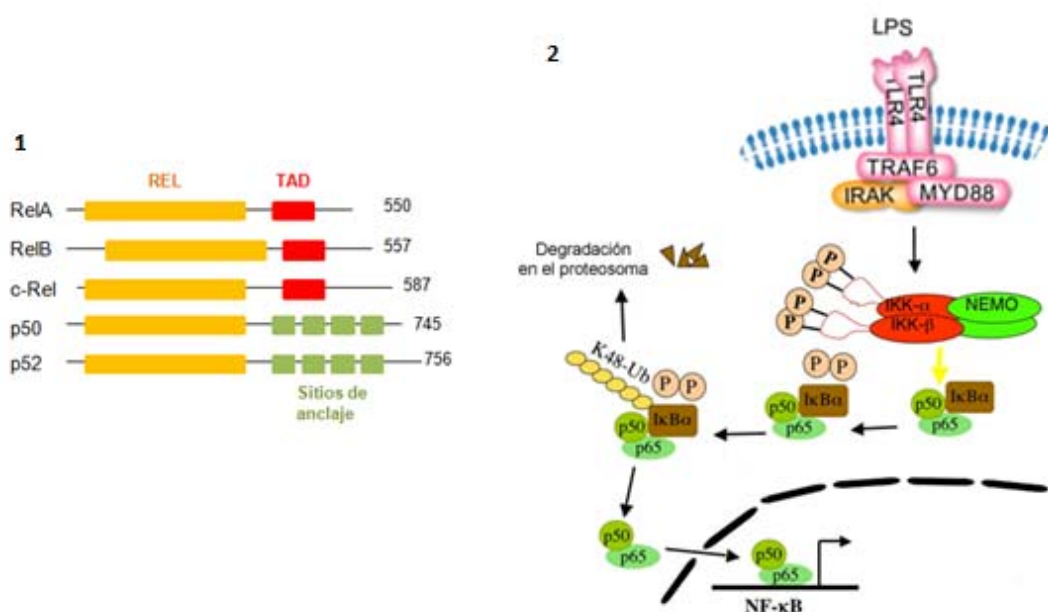
### 1.1. Activación de macrófagos por LPS.

El LPS es uno de los principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que actúa como un potente activador de macrófagos. Ejerce su función señalizando principalmente a través del receptor *Toll like 4* (TLR4), asociado a los receptores CD14 y CD11b/CD18 (Moore *et al.*, 2000; Takeuchi y Akira, 2010). La unión del LPS al TLR4 o a la proteína de unión a LPS (LBP), asociada a CD14, provoca la activación del complejo molecular MyD88/IRAK, que a su vez es capaz de activar la señalización mediada por ERK, JNK, p38, PKC y el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) induciendo la expresión de genes diana, entre los que se encuentran, entre otros, muchos de los genes descritos anteriormente como factores proinflamatorios, como IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, iNOS, COX-2 y mPGES-1 (An *et al.*, 2002; Doyle y O'Neill, 2006).

#### 1.1.1. El factor NF- $\kappa$ B.

Como consecuencia de la estimulación de los macrófagos con LPS tiene lugar, entre otras acciones, la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción juega un papel relevante en la regulación de la expresión génica en el sistema inmune. Además, participa en la regulación de la expresión de genes importantes para la supervivencia, diferenciación y proliferación celular. Infecciones bacterianas y víricas, citoquinas inflamatorias y la unión de antígenos a receptores, promueven la activación de NF- $\kappa$ B, que también puede inducirse por estrés físico, fisiológico u oxidativo (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). La desregulación de NF- $\kappa$ B se ha asociado con enfermedades como cáncer, enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y cardiovasculares, entre otras (Hayden y Ghosh, 2012). En mamíferos, se han descrito 5 miembros de la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B:

p50, p52, Rel A (p65), c-Rel y Rel B. Todos comparten un dominio N-terminal de unión al ADN, denominado dominio de homología a Rel (RHD), mediante el cual pueden formar homo y heterodímeros (**Figura A1**). Los dímeros de NF-κB se pueden unir a secuencias de ADN en genes diana, llamadas sitios de respuesta a NF-κB, que modulan la expresión génica. Rel B, c-Rel y Rel A, contienen un dominio c-terminal de activación de la transcripción (TAD) que permite el reclutamiento de coactivadores y la activación de genes diana. p50 y p52, al carecer del dominio TAD, pueden activar la transcripción de genes formando heterodímeros con los anteriores, o reclutando otras proteínas que tengan uno de estos dominios. Sin embargo, como homodímeros, pueden actuar como represores transcripcionales uniéndose al ADN (Hayden y Ghosh, 2011). En la mayoría de las células, los complejos NF-κB se encuentran inactivos en el citoplasma, unidos a proteínas inhibitoras de la familia IκB (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, p100, p105, Bcl3, IκBns). Ante un estímulo activador, como el caso del LPS en macrófagos, la proteína IκB es degradada y los dímeros de NF-κB entran al núcleo, donde modulan la expresión del gen diana. Generalmente, la degradación de la proteína inhibidora es mediada por el complejo de la quinasa IκB o IκK (complejo formado por dos subunidades catalíticas: IκKα e IκKβ y una subunidad reguladora: IκKy o NEMO) que fosforila IκB, lo que produce su degradación por el proteosoma (Liu y Chen, 2011) (**Figura A2**).



**Figura A.** Miembros de la familia NF- κB (1). Ruta de activación clásica de NF-κB (2).

## 1.2. El calcio en la activación de células del sistema inmune.

El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un papel fundamental en numerosos procesos biológicos tanto en células animales como en vegetales. Interviene en la contracción de

los músculos y en la coagulación de la sangre (Lages y Weiss, 1995). También controla la fertilización, y el desarrollo y diferenciación de células en otras más especializadas, además de participar en la regulación de la actividad celular y en la apoptosis (Berridge *et al.*, 1998; Chen y Lin-Shiau, 2000).

En el sistema inmune, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la función celular, participando en la regulación de la proliferación, de la expresión génica y en procesos de migración y apoptosis, entre otras funciones efectoras (Vig y Kinet, 2009). Aumentos en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en células del sistema inmune tienen lugar como resultado de la estimulación de inmunorreceptores, tales como el receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR) y los receptores de Fc (FcR), así como receptores de quimioquinas o receptores co-estimuladores. La principal vía que induce un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los linfocitos es la entrada de calcio a través de canales SOCE (*store-operated calcium entry*) y canales CRAC (*calcium-release-activated channels*). Tras la unión del antígeno al TCR o al BCR, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se pueden incrementar de 50 nM a  $\sim 1 \mu\text{M}$  a través de estos canales iónicos (Baba y Kurosaki, 2011; Feske, 2007).

Si bien es en la función de los linfocitos donde se ha reconocido de forma tradicional la influencia del  $\text{Ca}^{2+}$ , cada vez son más las evidencias que ponen de manifiesto su papel en otros tipos celulares dentro del sistema inmune como mastocitos, neutrófilos, células dendríticas y en osteoclastos (Kajiya, 2012; Ma y Beaven, 2011; Shumilina *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2007).

En cuanto a monocitos-macrófagos, aunque existen algunas evidencias que indican la posible relevancia de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en éstos, como la existencia de canales CRAC (Floto *et al.*, 1996; Malayev y Nelson, 1995), no se conoce en detalle la relevancia de sus acciones sobre la activación y sobre las funciones efectoras de este tipo celular. Se ha descrito que el tratamiento con un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca una activación del macrófago para procesos como la eliminación de células tumorales (Drysdale *et al.*, 1987). En macrófagos alveolares expuestos a partículas finas, se ha visto que el  $\text{Ca}^{2+}$  y especies reactivas del oxígeno (ROS), median la producción de  $\text{TNF}\alpha$  vía NF- $\kappa\text{B}$  y AP-1 (Brown *et al.*, 2004). Por otro lado, existen estudios que muestran una disminución en la producción de citoquinas inflamatorias cuando se inhibe el incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Haskó *et al.*, 1998; Hotchkiss *et al.*, 1995; Lo y Lo, 2013).

Muchas de estas observaciones se han obtenido de forma experimental mediante el uso de compuestos que incrementan el de  $\text{Ca}^{2+}$  como son los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , ionomicina (Io) o A23187 (Ion), los cuales promueven un incremento transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como consecuencia tanto de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, como de la movilización de calcio de los compartimentos intracelulares, como el retículo endoplásmico (Dedkova EN, 2000).

Además muchos receptores de moléculas que participan en la activación del sistema inmune transmiten su señal mediante incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, entre los que podemos destacar la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), asociados a la proteína  $G_{\alpha q}$ , entre los que se incluyen receptores de prostanoïdes y quimioquinas entre otros (Del Corno *et al.*, 2001; Lattin *et al.*, 2007; Wettschureck y Offermanns, 2005). El principal efector de la proteína  $G_{\alpha q}$  es la fosfolipasa C (PLC- $\beta$ ) cuya activación lleva a la hidrólisis de fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato (PIP2), dando inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), los cuales actuarán como segundos mensajeros promoviendo una cascada de señalización intracelular. El IP3 media la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares, promoviendo una cascada de señales. Por su parte, el DAG, junto con el propio calcio, promueve la activación de PKC, que conduce a su vez a la activación de la señalización por MAPKs como ERK y JNK (Gether y Kobilka, 1998; Hubbard y Hepler, 2006; Neer, 1995).

### 1.2.1. Activación de NFAT.

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular media gran parte de sus acciones a través de su unión a la proteína calmodulina (CaM). El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM es capaz de modular la función de varias proteínas como la  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM Proteína Quinasa II (CaMKII) y la proteína fosfatasa calcineurina (Cn), promoviendo su activación (Hoeflich y Ikura, 2002; Valeyev *et al.*, 2008). Por su parte, la Cn activada participa en la activación del factor de transcripción NFAT, modulando la regulación de la expresión de genes.

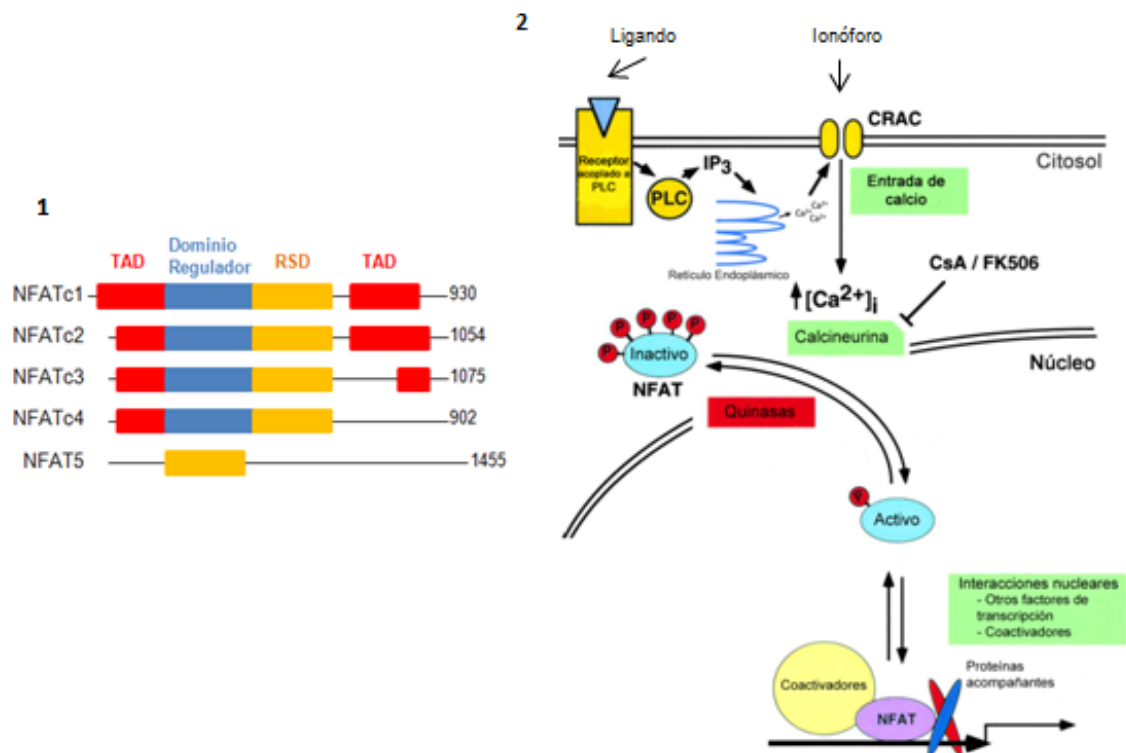
Las proteínas que pertenecen a la familia de factores de transcripción NFAT (factor nuclear de células T activadas), juegan un papel central en la transcripción inducible de genes durante la respuesta inmune. Aunque NFAT fue originalmente descrito en células T, se ha descrito su expresión en otras células inmunes, incluyendo: células dendríticas, neutrófilos, basófilos y macrófagos (Müller y Rao, 2010; Rao *et al.*, 1997). Además, en los últimos años se ha confirmado que NFAT se expresa también en múltiples células no inmunes, regulando procesos tan diversos como la formación de las

válvulas cardíacas, la especificidad de fibras en el músculo esquelético, la diferenciación de osteoclastos, el desarrollo neuronal y la angiogénesis, entre otros (Crabtree y Olson, 2002; Horsley y Pavlath, 2002; Schulz y Yutzey, 2004).

La familia NFAT está compuesta por 5 proteínas evolutivamente relacionadas con la familia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Pueden subdividirse en dos grupos de acuerdo a sus dominios funcionales: NFAT5 y NFATc. A su vez, NFATc incluye 4 miembros: NFATc1 (NFAT2 o NFATc), NFATc2 (NFAT1 o NFATp), NFATc3 (NFAT4 o NFATx) y NFATc4 (NFAT3). Todos los NFATc, tienen un dominio de unión al DNA denominado RSD, de la familia del Rel de los NF- $\kappa$ B; un dominio regulador requerido para la unión de Cn, motivos ricos en serina y señales de localización nuclear; y dos dominios transactivadores (TAD) en N- y C-terminal, excepto NFATc4 que sólo tiene el N-terminal. NFAT5 sin embargo, sólo presenta el dominio de unión al DNA, diferenciándose de los miembros NFATc en que su activación no es dependiente de la movilización de calcio, expresándose en respuesta a estrés osmótico (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2001; Serfling *et al.*, 2004; Zanoni y Granucci, 2012). La actividad de las isoformas NFATc1-c4 es controlada por la Cn que una vez activada por un incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , desfosforila los motivos fosforilados del extremo N-terminal de NFATc, produciéndose la translocación de NFAT al núcleo. En el núcleo, las proteínas NFATc actúan como factores de transcripción solas o interactuando con otros factores de transcripción activados por vías de señalización diferentes, como NF- $\kappa$ B, AP-1 y GATA4 (**Figura B**).

Las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de la Cn son los principales controladores de las funciones mediadas por NFAT. La Cn activa se une directamente a NFAT desfosforilando los motivos ricos en serina, que dejan al descubierto las secuencias de localización nuclear requeridas para la translocación al núcleo. Una persistente elevación  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es fundamental para la activación de Cn y para la permanencia de NFAT en el núcleo. En ello participan los canales de calcio CRAC, que tras una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular proveniente del retículo endoplásmico, se activan facilitando una alta y sostenida entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Crabtree, 2001). Una vez terminada la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , o mediante el uso de los compuestos inmunosupresores ciclosporina A (CsA) y FK506 que inhiben la actividad de la Cn, se produce una rápida refosforilación de NFAT y su salida del núcleo en la que participan proteínas quinasas (del Arco *et al.*, 2000; Martinez-Martinez y Redondo, 2004; Schreiber y Crabtree, 1992). Además, la activación transcripcional de NFAT puede regularse también mediante la

fosforilación inducible del dominio transactivador TAD (Gómez-Casero *et al.*, 2007; San-Antonio *et al.*, 2002).



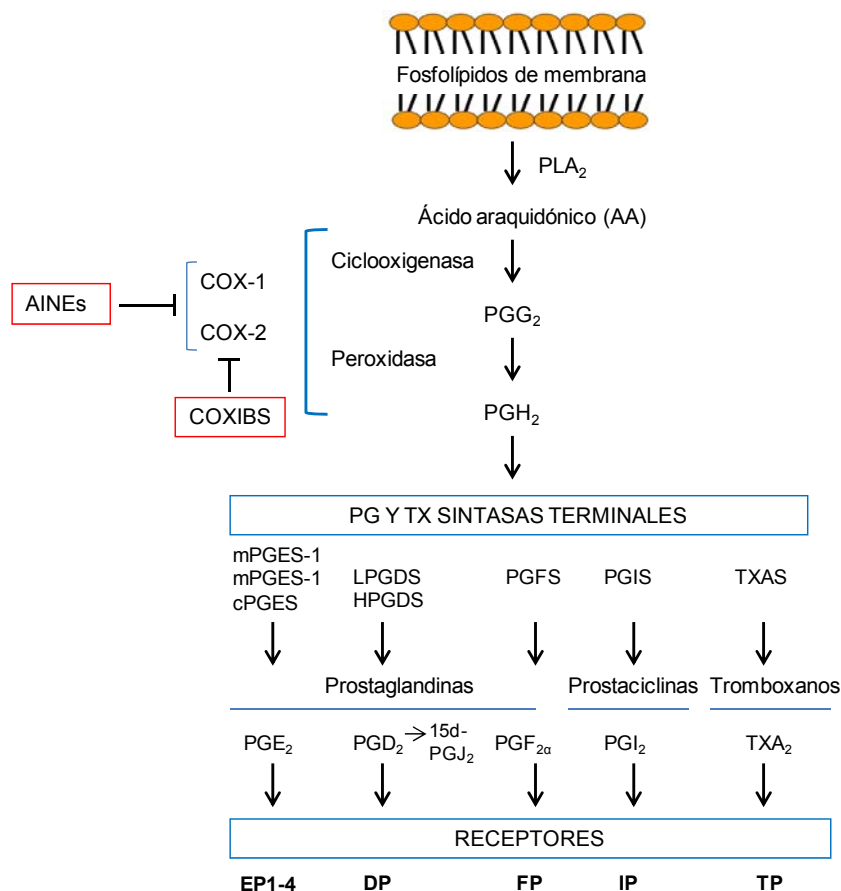
**Figura B.** Miembros de la familia NFAT (1). Ruta de activación del factor NFAT (2).

## II. COX-2 Y PROSTANOIDES COMO MEDIADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

Los prostanoideos son importantes mediadores lipídicos pertenecientes a un grupo de compuestos llamados eicosanoides, que derivan de ácidos grasos insaturados de 20 carbonos, siendo el más importante de éstos el ácido araquidónico (AA). Incluyen prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), compuestos involucrados en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos, como la maduración de cuerpos lúteos, la función renal, la agregación plaquetaria, la fiebre, el dolor o la inflamación. De tal forma, los prostanoideos parecen jugar un papel esencial en patologías como la trombosis, la alergia, el cáncer, y en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide o la aterosclerosis (Ricciotti y FitzGerald, 2011; Vila, 2004).

## 2. Síntesis de prostanoides.

La síntesis de prostanoides tiene lugar a partir de fosfolípidos de membrana a través de la cascada metabólica del AA (**Figura C**). La acción de la fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) sobre la membrana en respuesta a un estímulo, provoca una hidrólisis que da lugar a la liberación del AA. Éste, es convertido en PGH<sub>2</sub> por las ciclooxigenasas (COXs) en una reacción de dos pasos que implica, una reacción ciclooxigenasa que genera PGG<sub>2</sub>, seguida de una reacción peroxidasa que genera la PGH<sub>2</sub>. Esta molécula es el sustrato para las diferentes PG sintasas terminales (PGES, PGDS, PGFS y TXAS), que generan las distintas prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> o prostaclicina) y tromboxanos (TXA<sub>2</sub>) (Smith y Song, 2002; Warner y Mitchell, 2004). La síntesis última de un prostanoides u otro dependerá, en gran medida, de la asociación entre las COXs y las diferentes PG sintasas, por lo que ambos tipos de enzimas son claves en la regulación de la vía. Sin embargo, han sido las COXs las que han centrado mayoritariamente el interés para el diseño de fármacos, siendo diana para los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).



**Figura C.** Biosíntesis de prostanoides.



## 2.1. Ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2).

Se han descrito dos isoformas de la COX, denominadas COX-1 y COX-2. Ambas catalizan la misma reacción pero difieren en la regulación de su expresión ante diferentes estímulos (Morita, 2002). COX-1 se expresa constitutivamente y es la forma dominante, aunque no exclusiva, en la producción de prostanoïdes para las funciones de mantenimiento fisiológicas, como la protección del epitelio gástrico y la homeostasis vascular. Esta isoforma se asocia preferentemente con las sintasas TXAS, PGFS y PGES citosólica (cPGES). Por otro lado, COX-2, que se induce por estímulos inflamatorios, hormonas y factores de crecimiento, es la fuente principal de prostanoïdes en procesos inflamatorios y en enfermedades proliferativas como el cáncer. Su acción se acopla preferentemente a las sintasas PGIS y PGES microsomal (mPGES), ambas inducidas por citoquinas, factores de crecimiento y promotores tumorales (Dubois *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2000; Tanioka *et al.*, 2000). Sin embargo, tanto COX-1 como COX-2 contribuyen en la generación de prostanoïdes implicados en homeostasis como en la formación de prostanoïdes durante la inflamación (Crofford *et al.*, 1994; McAdam *et al.*, 2000).

Los prostanoïdes tienen una vida media corta, por lo que ejercen su función en las inmediaciones de donde han sido sintetizados, mediante la unión a receptores (**Figura C**). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y están clasificados según su especificidad por los diferentes prostanoïdes que actúan como ligandos: DP para PGD<sub>2</sub>, EP para PGE<sub>2</sub>, FP para PGF<sub>2α</sub>, IP para PGI<sub>2</sub> y TP para TXA<sub>2</sub> (Breyer *et al.*, 2001). Algunos de ellos tienen varios subtipos, destacando el receptor para PGE<sub>2</sub> que tiene 4: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>, cada uno ligado a diferentes rutas de transducción que dan lugar a la activación o la inhibición de las respuestas celulares (Alfranca *et al.*, 2006). En general podemos decir que EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>, IP y DP<sub>1</sub>, señalizan a través de proteínas G<sub>qs</sub>, incrementando el adenosín monofosfato cíclico (AMPC). EP<sub>1</sub>, FP, y TP activan el metabolismo del fosfatidilinositol y provocan el aumento de IP<sub>3</sub> con movilización de Ca<sup>2+</sup> de los compartimentos intracelulares. TP se acopla a múltiples proteínas G, por lo que además puede activar o inhibir la adenilato ciclasa y por tanto aumentar los niveles de AMPC intracelulares. Las distintas isoformas de EP<sub>3</sub> pueden acoplarse a proteínas G<sub>ai</sub> o G<sub>α12</sub> para elevar los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, inhibir la generación de AMPC o la activación de proteína GTPasa Rho. El DP<sub>2</sub> se acopla a proteínas tipo G<sub>α</sub> para inhibir la síntesis de AMPC y eleva el Ca<sup>2+</sup> intracelular (Smyth *et al.*, 2009; Tilley *et al.*, 2001).

Además de estos receptores clásicos, estudios recientes han demostrado que los prostanoides también pueden modificar la función de células del sistema inmune mediante la activación directa de receptores nucleares. Un metabolito de la PGD<sub>2</sub>, la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15-dPGJ<sub>2</sub>), es un potente agonista del receptor PPAR (Receptor activado por proliferadores de peroxisomas) (Straus y Glass, 2001). A este receptor nuclear, que se expresa a altos niveles en macrófagos, se le atribuyen acciones antiinflamatorias (Jiang *et al.*, 1998).

### 2.1.1. Regulación de la expresión de COX-2.

Los macrófagos aumentan la expresión de COX-2 en respuesta a estímulos proinflamatorios, como LPS o citoquinas. El principal mecanismo de regulación de esta enzima tiene lugar a nivel transcripcional, aunque también han sido descritos mecanismos de regulación post-transcripcional, basados en el aumento de la estabilidad del ARNm (Inoue *et al.*, 2002; Tsatsanis *et al.*, 2006).

Diferentes factores de transcripción pueden regular COX-2 dependiendo del estímulo y del tipo celular. El promotor del gen de la COX-2 humano contiene una *TATA-box* clásica, una *E-box* y varios sitios de unión para factores de transcripción, muy conservados en humano, ratón y rata. Hasta la fecha, han sido descritos elementos CRE, AP-1, C/EBP, NF- $\kappa$ B, y NFAT en la región proximal del promotor de COX-2, mientras que en posición distal se han encontrado también, sitios IRES de respuesta a IFN $\gamma$ , a los cuales se unen los correspondientes factores y regulan su transcripción (Íñiguez *et al.*, 2000; Tanabe y Tohnai, 2002; Vila-del Sol y Fresno, 2005).

La activación de COX-2 mediada por NF- $\kappa$ B es la más estudiada, especialmente por el papel central que tiene este factor de transcripción en la inflamación y en la señalización de COX-2 vía TLR4 en macrófagos (Rhee y Hwang, 2000; Tsatsanis *et al.*, 2006). La regulación de COX-2 es mediada por NFAT en células de carcinoma de colon, linfocitos T y en células del endotelio vascular (Duque *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2001; Íñiguez *et al.*, 2000). Inicialmente varios trabajos han tratado de atribuir a un solo factor de transcripción el control principal de transcripción de COX-2, pero un estudio mas reciente aboga por un modelo de regulación dinámico en el cual la unión de diversos factores de transcripción se sucedería en el tiempo (Kang *et al.*, 2006).

En muchos tipos celulares y en respuesta a estímulos inflamatorios que inducen la expresión de COX-2, se produce la inducción coordinada de la mPGES-1, resultando

en un incremento exacerbado en la producción de  $\text{PGE}_2$ . En ello, intervienen, aparte de la activación transcripcional de cada enzima, mecanismos capaces de señalar la localización subcelular de ambas, posibilitando la asociación entre COX-2 y mPGES-1 en la región perinuclear de la célula (Duque *et al.*, 2006; Lazarus *et al.*, 2002).

## 2.2. Acciones de los prostanoides en la inflamación.

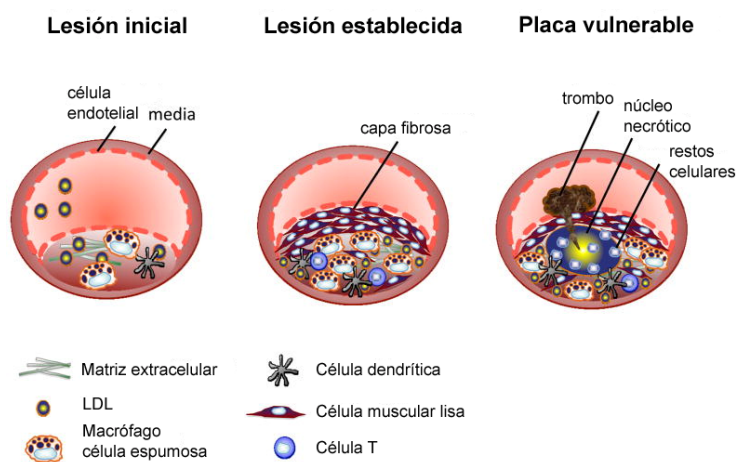
Durante la fase temprana de la inflamación, los macrófagos producen cantidades elevadas de  $\text{PGE}_2$ , considerada la prostaglandina inflamatoria por excelencia y potente inmunomodulador. Su expresión se asocia a COX-2 y mPGES-1 en el foco inflamatorio, mientras que en condiciones fisiológicas su expresión se asocia a COX-2 y cPGEs. La  $\text{PGE}_2$ , es capaz de regular la expresión de citoquinas proinflamatorias, como el  $\text{TNF}\alpha$ , la IL-1 $\beta$  o la iNOS; y antiinflamatorias como IL-10 (Lin *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 2013; Nataraj *et al.*, 2001). También participa en el reclutamiento de monocitos y células dendríticas al foco inflamatorio mediante la regulación de quimioquinas (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1) y de sus receptores (CCR2, CCR5 o CCR7). Además, participa en la remodelación del tejido dañado mediante la activación de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (Panzer y Uguccioni, 2004; Pavlovic *et al.*, 2006).

Aunque la  $\text{PGE}_2$  es la prostaglandina mayoritaria en el proceso inflamatorio, los macrófagos también producen  $\text{PGJ}_2$  y 15-d $\text{PGJ}_2$ , que a través de los PPAR, controlan la apoptosis de las células inmunes en la finalización del proceso inflamatorio (Ward *et al.*, 2002). Además, la 15-d $\text{PGJ}_2$  también es capaz de disminuir la liberación de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12, interfiriendo directamente en la señalización de NF- $\kappa$ B (Alves *et al.*, 2011; Straus *et al.*, 2000).

Los AINEs, como la aspirina, son antiinflamatorios que se basan en la inhibición de la síntesis de prostanoides, bloqueando inespecíficamente tanto la actividad COX-1 como COX-2. Por tanto, inhiben la producción de prostanoides en procesos fisiológicos y patológicos, provocando efectos secundarios de tipo gastrointestinal, como úlceras y hemorragias digestivas, atribuidos principalmente a la inhibición de COX-1. La generación de inhibidores selectivos de COX-2 disminuyó la aparición de estos efectos secundarios, pero su uso produjo un aumento de eventos cardiovasculares en pacientes sometidos a esta medicación. Este hecho supuso el inicio de la investigación de COX-2 en numerosas patologías cardiovasculares, como la aterosclerosis (Martinez-Gonzalez y Badimon, 2007).

### III. ATEROSCLEROSIS Y PROSTANOIDES.

La aterosclerosis es la causa subyacente de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo: enfermedad coronaria arterial, gangrena isquémica, aneurisma aórtico abdominal, y muchos casos de infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares, como consecuencia de una ruptura de la placa y la generación de un trombo. En la actualidad, este grupo de enfermedades, son la principal causa de muerte en las sociedades industrializadas y la Organización Mundial de la Salud prevé que en breve, lo sean a nivel mundial, debido al incremento de su prevalencia y la acumulación de factores de riesgo metabólico en nuestra sociedad (Hansson *et al.*, 2006; Libby, 2002; Moore y Tabas, 2011).



**Figura D.** Progresión y composición de la placa de ateroma.

El desarrollo de la placa de ateroma comienza con una lesión inicial caracterizada por la acumulación de lipoproteínas en la íntima provocando el reclutamiento de macrófagos y células dendríticas. Conforme la lesión progresa, empiezan a migrar a la íntima, células musculares lisas y linfocitos T, formando una cápsula fibrosa. La placa vulnerable se caracteriza por la acumulación de células apoptóticas y una eferocitosis deficiente, generando un núcleo necrótico que es rodeado por células inmunes que contribuyen a la ruptura de la placa y la formación de un trombo.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y progresiva que se caracteriza por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en la pared arterial, produciéndose habitualmente en las zonas donde el flujo laminar sanguíneo está perturbado, como las ramificaciones y válvulas aórticas. La acumulación de estos componentes da lugar a una placa cada vez más compleja que va provocando el estrechamiento luminal de las arterias. Su mayor complicación clínica se produce por la rotura de esta placa, provocando trombosis. **(Figura D)**. Es una enfermedad multifactorial en la que participan procesos como el metabolismo de ácidos grasos, la presión sanguínea o la respuesta inflamatoria (Glass y Witztum, 2001; Lusis, 2000).

#### 4. Papel del colesterol en la aterosclerosis.

El aumento de los niveles de LDL/VLDL (*low density lipoproteins/very low density lipoproteins*) en sangre es el principal desencadenante del inicio de la enfermedad (Goldstein y Brown, 1977; The Emerging Risk Factors, 2009). El transporte de lípidos, colesterol y triglicéridos, se produce a través del flujo sanguíneo. Los lípidos ingeridos en la dieta son transportados al hígado para metabolizarse, al tejido adiposo para su acumulación o, bien, se mantienen en circulación para su adquisición por tejidos periféricos, ya que el colesterol es clave para el correcto funcionamiento de las membranas celulares. Por este motivo, todas las células del organismo necesitan adquirir colesterol. El colesterol sobrante desde los tejidos periféricos, vuelve al hígado para su excreción, lo que se conoce como el transporte reverso (Fitzgerald *et al.*, 2010). Todas las moléculas de naturaleza lipídica son insolubles, por lo que para su transporte en sangre necesitan acoplarse a proteínas, formando así complejos macromoleculares llamados lipoproteínas. Existen diferentes tipos de lipoproteínas, clasificadas de acuerdo a su densidad, que participan en los diferentes pasos del transporte lipídico. Los quilomicrones captan los triglicéridos, colesterol y fosfolípidos ingeridos en la dieta y se encargan de transportarlos hasta el hígado para ser metabolizados. De allí, viajan hasta los tejidos periféricos en forma de LDL o VLDL. Finalmente, las HDL (*high density lipoproteins*) son las encargadas de llevar el colesterol sobrante de estos tejidos de vuelta al hígado para su excreción (Glass y Witztum, 2001). En la aterosclerosis, los niveles de HDL y LDL se encuentran alterados, lo que promueve el depósito de colesterol en la pared arterial.

Los modelos de aterosclerosis en ratón, siendo los más usados habitualmente el modelo *Ldlr*<sup>-/-</sup> y el *Apoe*<sup>-/-</sup>, se han generado en base a alteraciones en genes implicados en el transporte lipídico (Fuster *et al.*, 2012). El primero carece del receptor para las LDL el cual, tiene un papel clave en el hígado (Krieger, 1994). El modelo *Apoe*<sup>-/-</sup> carece de la apolipoproteína E, constituyente importante de quilomicrones, LDL, VLDL y HDL (Mahley *et al.*, 1984). El ratón *Ldlr*<sup>-/-</sup> requiere de la administración de una dieta rica en grasa para generar las lesiones, que tienen una morfología simple, siendo las células espumosas las células predominantes. Las lesiones en el ratón *Apoe*<sup>-/-</sup>, comienzan con una morfología simple de células espumosas, que va adquiriendo complejidad con la edad, incluyendo así, núcleos lipídicos, cristales de colesterol y cápsulas fibrosas. Este modelo de ratón no requiere de una dieta aterogénica para producir las lesiones, ya que presentan una alta hipercolesterolemia de base. No obstante, la administración de una dieta grasa acelera el desarrollo de la enfermedad sin cambiar las características

morfológicas de la lesión (Daugherty y Whitman, 2003; Fuster et al., 2012). Aunque ambos modelos son muy útiles en el estudio experimental del proceso aterosclerótico en tanto en cuanto reflejan algunas de las características de la enfermedad como la formación de la placa de ateroma, ninguno de ellos es capaz de cubrir la secuencia completa de las lesiones humanas y la formación de placas inestables que reflejen los riesgos asociados a la rotura de la placa.

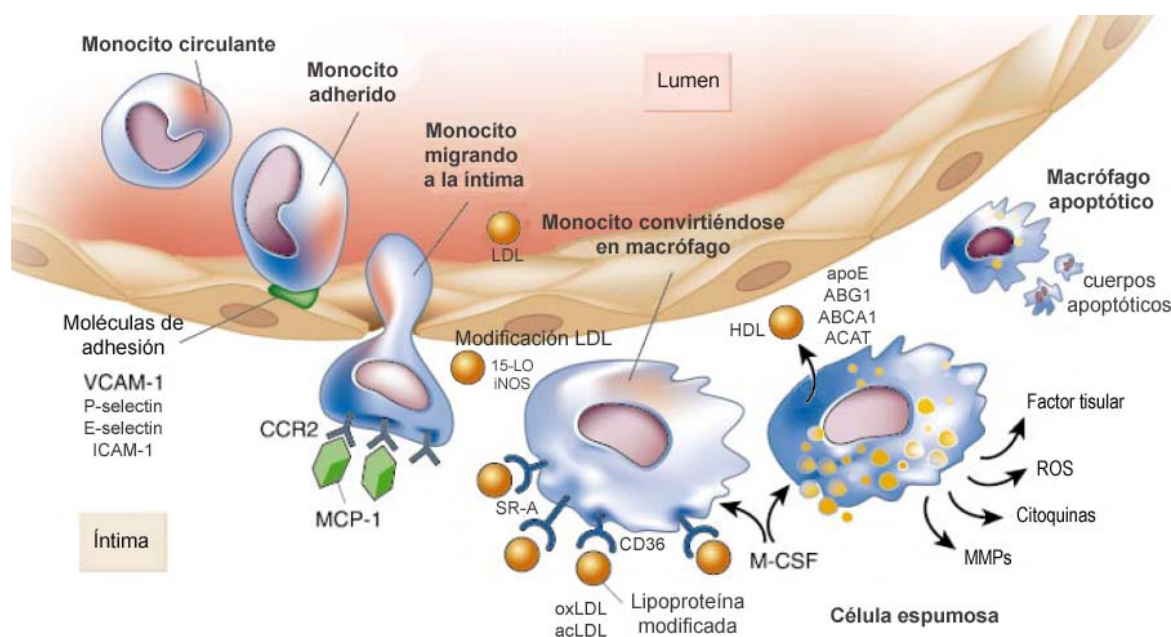
## 5. Macrófagos e inflamación en el desarrollo de aterosclerosis.

La composición de la placa de ateroma se puede describir, en fases avanzadas, como un núcleo necrótico de células, cristales de colesterol, rodeado de células espumosas e infiltrados de células inmunes. La población celular mayoritaria son los macrófagos, pero la presencia de células T, células dendríticas, mastocitos e incluso células T reguladoras, ha sido ampliamente descrita en lesiones de ratón y humanas (Galkina y Ley, 2009; Packard *et al.*, 2009). Además de células del sistema inmune, encontramos células endoteliales y células musculares lisas, debido a la desestructuración del endotelio generada por la acumulación de colágeno. Aunque la síntesis de colágeno favorece la estabilización inicial de la placa, en estadios tardíos se produce la activación de MMPs, que provocan su degradación y el aumento del riesgo de trombosis.

La fase inicial de la enfermedad aterosclerótica se desencadena cuando los niveles de VLDL y LDL aumentan. Las lipoproteínas infiltran la pared arterial a un nivel que excede la capacidad de eliminación y quedan retenidas en la pared extracelular, asociándose con constituyentes de la matriz extracelular como proteoglicanos. Esta retención, secuestra las lipoproteínas en la íntima, protegiéndolas de los antioxidantes presentes en el plasma, lo que favorece así su modificación, principalmente por oxidación (oxLDL) o acetilación (acLDL) (Navab et al., 1996; Steinberg et al., 1989). Estas partículas evocan la respuesta inflamatoria, ya que atraen a los monocitos directamente a la pared arterial. Además de las LDLs modificadas y las fuerzas hemodinámicas, otros factores modulan la inflamación, como los niveles de homocisteína, las hormonas sexuales y la infección. Enfermedades como la diabetes también pueden promover la inflamación, por la formación de productos finales de glicosilación que interactúan con los receptores endoteliales (Lusis, 2000). Debido a este ambiente proinflamatorio, las células endoteliales, que normalmente son resistentes a la adhesión leucocitaria, expresan moléculas de adhesión como P-selectina, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, que median el rodamiento y la adhesión de monocitos



circulantes y otros leucocitos (Cybulsky y Gimbrone, 1991; Johnson et al., 1997; Li et al., 1993). Estos monocitos, y células T principalmente, se unen a las moléculas del endotelio mediante integrinas como VLA-4 y LFA-1 (Glass y Witztum, 2001; Packard et al., 2009). Quimioquinas como MCP-1, producida por células de la pared arterial en respuesta a las LDL modificadas, dirigen la migración y diapédesis de los monocitos a la íntima (Boring et al., 1998; Gu et al., 1998; Pello et al., 2011). Una vez allí, la citoquina M-CSF estimula la proliferación y diferenciación de macrófagos, influyendo en procesos tales como la expresión de *scavenger receptors* (Qiao et al., 1997; Smith et al., 1995) (Figura E).



**Figura E.** Papel de los macrófagos en la aterosclerosis. Adaptado de Libby, P. (2002)

### 5.1. Formación de células espumosas y regulación del flujo de colesterol en el macrófago.

Los *scavenger receptors*, principalmente SR-A y CD36, son los responsables del siguiente acontecimiento clave en la formación de la lesión: la generación de células espumosas. Los monocitos, una vez diferenciados a macrófagos en la íntima, aumentan la expresión de estos receptores, lo que les permite captar las partículas LDL modificadas. Existe cierta especialización en estos dos receptores, de manera que SR-A es más específico para la captación de partículas acLDL y CD36 para oxLDL (Endemann et al., 1993; Loughheed et al., 1999; Nakata et al., 1999). Estudios como el de Kunjathoor et al. han descrito que el receptor SR-A también puede captar oxLDLs,

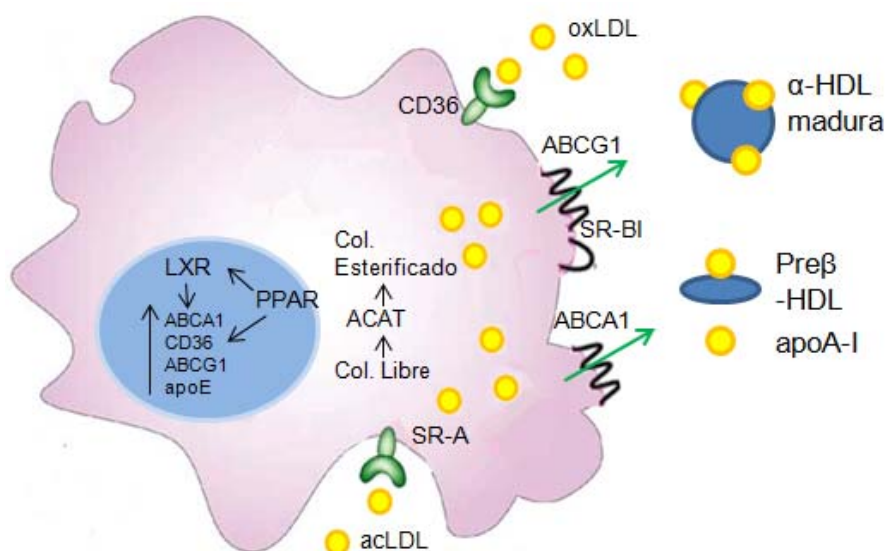
especialmente las que presentan un mayor grado de oxidación, mientras que CD36 captaría oxLDLs con una oxidación intermedia (Kunjathoor *et al.*, 2002). Experimentos en ratones *Cd36<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y en otros modelos donde se silenció el receptor SR-A, mostraron un papel proaterogénico para estos receptores (Babaev *et al.*, 2000; Febbraio *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios empleando ratones *Cd36<sup>-/-</sup>* o *Sr-a<sup>-/-</sup>* en un modelo de *ApoE<sup>-/-</sup>*, mostraron un aumento de las lesiones, y en modelos que carecían de ambos receptores, no se vieron reducciones mayores que las encontradas en modelos *Cd36<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* (Kuchibhotla *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2005). Se ha demostrado que existe una regulación recíproca entre estos dos receptores, de manera que la inhibición de uno, aumenta la expresión del otro (Mäkinen *et al.*, 2010). En cualquier caso, se han descrito además, mecanismos de captación alternativos como la fagocitosis y la pinocitosis, entre otros, que pueden participar en este proceso (Kruth, 2013; Moore y Tabas, 2011; Schrijvers *et al.*, 2007). Aunque los macrófagos presentan otros receptores de membrana capaces de captar colesterol, como el LDLr, éste no participa en la generación de células espumosas, puesto que reconoce partículas LDL intactas o poco modificadas, mientras que la mayoría de las formas de LDL que encontramos en la placa de ateroma se encuentran alteradas (Glass y Witztum, 2001). El mecanismo de captación de LDLs por parte de los macrófagos, constituye un proceso beneficioso inicialmente, puesto que permite eliminar grandes cantidades de LDLs modificadas de la pared vascular. Sin embargo, cuando la acumulación de estas partículas supera la tasa de salida, se produce la muerte de los macrófagos, principalmente por apoptosis, provocando una fuerte respuesta inmune (Andrés *et al.*, 2012; Hegyi *et al.*, 2001).

En condiciones normales, los macrófagos residentes en la íntima son capaces de liberar colesterol libre no esterificado y de sintetizar las lipoproteínas, apoE y apoA-I, aceptoras del mismo, con lo que se impide su acumulación en el tejido. Ante un exceso de colesterol en el tejido, los macrófagos lo acumulan en forma de ésteres de colesterol en vacuolas gracias a la acción de la Acyl-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT). Estos ésteres de colesterol, pueden ser hidrolizados para su incorporación en membranas y su salida. Existen dos mecanismos potenciales para eliminar el exceso de colesterol: la modificación del mismo a formas más solubles mediante la acción de la enzima colesterol-27 hidroxilasa, y el más importante, el flujo de colesterol al exterior mediante transportadores de membrana, proceso clave en el transporte reverso del colesterol (Figura F).

El transporte reverso del colesterol, es el mecanismo mediante el cual, HDL y su proteína mayoritaria, apoA-I, ejercen un papel protector contra la aterosclerosis. Se han



descrito muchos genes en el transporte reverse, incluyendo los transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*), ABCA1 y ABCG1; y también el *scavenger receptor* (SR) SR-BI. ABCA1 media el flujo desde los macrófagos a apoA-I, mientras que ABCG1 y SR-BI facilitan el flujo de colesterol a partículas HDL maduras (Fitzgerald *et al.*, 2010). Además de ABCA1, se han implicado en este proceso otros subtipos de transportadores ABC tipo A, como ABCA5. En los últimos años se ha atribuido un papel fisiológico a este transportador. Ye *et al.* mediante un modelo de trasplante de médula ósea de ratón *Abca5*<sup>-/-</sup> en ratones *Ldlr*<sup>-/-</sup> irradiados, encontraron un aumento de las lesiones ateroscleróticas, un 29% menos de flujo de colesterol a partículas HDL y incremento del flujo a partículas apoA-I por un aumento compensatorio de la expresión de ABCA1 (Ye *et al.*, 2010).



**Figura F.** Transporte reverse del colesterol en macrófagos.

En la regulación del flujo de colesterol en los macrófagos, incluyendo tanto la captación de LDLs modificadas como el flujo al exterior, tienen un papel importante los receptores PPAR y LXR (Receptor X hepático) (**Figura F**). PPARγ aumenta la expresión de CD36 (Tontonoz *et al.*, 1998), mientras que los LXR aumentan la expresión de ABCA1, ABCG1 y apoE, entre otros (Costet *et al.*, 2000; Repa y Mangelsdorf, 2002). Los dos se activan por oxLDL y existe una cooperación entre ambos, de manera que PPARγ es capaz de inducir LXRα (Chawla *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2011). Tanto PPAR como LXR son integradores de la regulación del metabolismo de lípidos y de la inflamación, con una señalización mediada por factores de transcripción como AP-1, NF-κB o STAT (Joseph *et al.*, 2003).

## 6. Acciones de los prostanoïdes en la aterosclerosis.

Los prostanoïdes juegan un importante papel en la fisiopatología cardiovascular, modulando la patogénesis de enfermedades vasculares como la trombosis o la aterosclerosis. Estos mediadores lipídicos intervienen en varios procesos clave de la aterosclerosis, como la inflamación, vasodilatación, vasoconstricción, agregación plaquetaria y migración leucocitaria, entre otros (Vila, 2004). Diferentes estudios han descrito la expresión de COX-2 en las lesiones ateroscleróticas en humanos y en ratón, donde parece jugar un papel dual en la patogénesis de la enfermedad (Baker *et al.*, 1999; Burleigh *et al.*, 2002; Schönbeck *et al.*, 1999). Los efectos de la expresión de COX-2 en aterogénesis son mediados por una variedad de prostanoïdes con funciones proaterogénicas y antiaterogénicas, que además, pueden variar durante la evolución de la placa y el tipo celular.

La aparición de los inhibidores selectivos de la COX-2 como nuevos y eficaces antiinflamatorios y analgésicos, puso de manifiesto el papel que podía ejercer esta enzima en la enfermedad cardiovascular. Estos inhibidores, conocidos como “superaspirinas” o “coxibs”, fueron diseñados para minimizar los efectos indeseados de índole gastrointestinal que producen habitualmente los AINES clásicos, por la inhibición de la COX-1 (Warner y Mitchell, 2004). Sin embargo, diversos ensayos clínicos demostraron el aumento en la aparición de eventos cardiovasculares, como infartos de miocardio o anginas de pecho, por el uso de estos inhibidores específicos (Bombardier *et al.*, 2000; Bresalier *et al.*, 2005; Paramo *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005). El análisis de los resultados obtenidos con estos ensayos, terminaron provocando la retirada voluntaria por parte de Merck, del primer inhibidor que salió al mercado, Vioxx (rofecoxib). Esto supuso un duro golpe para la industria farmacéutica y para la salida al mercado de otros muchos coxibs. Mientras que en el momento de su comercialización se consideró que estos medicamentos se convertirían en los nuevos superventas, actualmente, su uso está restringido a patologías relacionadas principalmente con la inflamación articular.

El principal motivo por el cual se explican los efectos adversos a nivel cardiovascular de estos inhibidores es por el incremento en el riesgo de trombosis, máxima complicación de la aterosclerosis, por lo que el estudio de COX-2 en esta patología ha sido objeto de intenso estudio en últimos años.

Los prostanoideos juegan un papel importante en la generación del trombo, siendo el control del balance de  $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$  esencial en este proceso. Las células endoteliales sintetizan  $\text{PGI}_2$  asociada a la expresión de COX-2, que ejerce acciones vasodilatadoras inhibiendo la agregación plaquetaria (McAdam *et al.*, 1999). Las plaquetas, por el contrario, producen  $\text{TXA}_2$  en un proceso dependiente de la actividad COX-1. Este tromboxano, tiene propiedades protrombóticas y vasoconstrictoras y su bloqueo mediante tratamiento con dosis bajas de aspirina, reduce el riesgo de trombosis y de daños en la pared vascular (Patrignani *et al.*, 1982). Sin embargo, el uso de inhibidores selectivos de COX-2, disminuye preferentemente la síntesis de  $\text{PGI}_2$  sobre la de  $\text{TXA}_2$ , lo que provoca un desajuste en el balance de estos dos prostanoideos, favoreciendo la vasoconstricción y la agregación plaquetaria y por tanto, el riesgo de trombosis (FitzGerald, 2004; Gabrielsen *et al.*, 2010).

La  $\text{PGE}_2$ , producida principalmente por los macrófagos activados, también se ha relacionado con la aterogénesis, el tono vascular y la rotura de placa. Sin embargo, su papel es más complejo ya que sus efectos pueden medirse por diferentes EPs. Así, se han descrito tanto efectos antiinflamatorios como proinflamatorios. Estudiando la acción de  $\text{PGE}_2$  en relación a las MMPs, se encontró que la liberación de  $\text{PGE}_2$  vía COX-2/mPGES-1, induce la expresión y activación de la MMP-1 y MMP-9, capaces de degradar la cápsula de colágeno y disminuyendo la estabilidad de la placa (Ardans *et al.*, 2002; Cipollone *et al.*, 2005; Pavlovic *et al.*, 2006). La mPGES-1, descrita como la máxima responsable de la síntesis de  $\text{PGE}_2$  en condiciones fisiológicas tanto en humanos como en ratón, también ha sido descrita en placas de ateroma. Algunos estudios, mantienen que el silenciamiento de mPGES-1 tiene las mismas propiedades que el de COX-2 pero sin que se produzcan estímulos protrombóticos (Wang *et al.*, 2008). Experimentos en ratones *Mpges-1<sup>-/-</sup>* en fondo *Ldlr<sup>-/-</sup>* han encontrado menos lesión y un aumento en la expresión de  $\text{PGI}_2$  (Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha postulado que la expresión de COX-2, según se asocie a mPGES-1 o a LPGDS, es vital para la estabilidad de la placa y que está directamente relacionado con el riesgo de padecer eventos cardiovasculares, debido a los papeles opuestos de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGD}_2$  (Cipollone *et al.*, 2004). La  $\text{PGD}_2$  producida por la acción de LPGDS, es la precursora de la 15-dPGJ<sub>2</sub>. La expresión de este ligando natural de PPAR $\gamma$  ha sido descrita en placas de ateroma humanas junto a COX-2 (Shibata *et al.*, 2002). Se le han atribuido acciones antiinflamatorias, por la acción que juegan los PPAR en la regulación del flujo de colesterol y la inflamación solos o a través de LXR (*liver X receptors*). La ausencia de la expresión de algún miembro de la familia de los PPAR, incrementa el

tamaño de las lesiones ateroscleróticas (Li *et al.*, 2004). De igual manera, el uso de ligandos de LXR evita el desarrollo de aterosclerosis en ratón (Joseph *et al.*, 2002).

Diversos estudios han relacionado las acciones de ciertos prostanoides con la regulación de entrada y salida del colesterol en macrófagos, mediante la activación los PPAR (Bujold *et al.*, 2009). El grupo de A.B Reiss, ha estudiado la implicación de COX-2 en la formación de células espumosas. Sus resultados, en experimentos *in vitro* en células THP-1, apuntan a que COX-2 participa en el mantenimiento homeostático de este flujo y que su inhibición provoca un aumento de CD36, una disminución de la expresión de la colesterol 27-hidroxilasa y de ABCA1, produciendo un aumento en la formación de células espumosas (Anwar *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2007).

### 6.1. Papel de COX-2 en la aterosclerosis.

Si bien parece claro que el balance de prostanoides puede jugar un papel esencial en el progreso de la enfermedad aterosclerótica, los estudios realizados para determinar las acciones de la COX-2 en aterosclerosis, muestran resultados contradictorios. Los efectos adversos provocados por los coxibs, favorecieron el desarrollo de muchos ensayos en modelos de ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> y *Ldlr*<sup>-/-</sup> usando inhibidores selectivos de COX-2. Burleigh *et al.*, en estudios realizados con ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> y *Ldlr*<sup>-/-</sup> sometidos a dieta rica en grasa, obtuvieron una disminución en el tamaño de las lesiones con la administración de celecoxib o indometacina. En trabajos en los que se trasplantan células de hígado fetal de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup> en animales *Ldlr*<sup>-/-</sup> alimentados con dieta rica en grasa se observó una disminución de las lesiones respecto a ratones trasplantados con células *Cox-2*<sup>+/+</sup> (Burleigh *et al.*, 2002; Burleigh *et al.*, 2005). Otras publicaciones, también han descrito un papel proaterogénico de COX-2 (Jacob *et al.*, 2008; Metzner *et al.*, 2007). Por otro lado, existen estudios que contradicen lo anterior. Algunos de éstos, mediante el uso de inhibidores de esta enzima, tanto en *Ldlr*<sup>-/-</sup> como en *Apoe*<sup>-/-</sup>, concluyen que COX-2 no afecta al desarrollo de la aterosclerosis, (Bea *et al.*, 2003; Belton *et al.*, 2003; Olesen *et al.*, 2002; Praticò *et al.*, 2001). Más recientemente, Narashima *et al.* empleando un modelo de ratón COX-2 silenciado en la línea mieloide (*Cox-2*<sup>M/M</sup>) con una base *Apoe*<sup>-/-</sup>, tampoco encuentra cambios en el desarrollo de la aterosclerosis (Narasimha *et al.*, 2010). Por otro lado, existen estudios que apuestan por un papel antiaterogénico de la COX-2, de tal forma que se observa un aumento de la lesión cuando se inhibe COX-2 en un modelo *Apoe*<sup>-/-</sup> (Rott *et al.*, 2003). En ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup> en un fondo mixto 129/C57BL6/J alimentados con dieta grasa, se ha descrito un papel antiaterogénico para COX-2, de tal forma que las lesiones fueron mayores en

ausencia de ésta, con un aumento de colesterol y de citoquinas proinflamatorias en los ratones deficientes en COX-2 (Narasimha *et al.*, 2007). Por último, Yi *et al.*, han descrito un aumento en las lesiones ateroscleróticas en un modelo de ratón en el que se silencia genéticamente COX-2 de manera postnatal en un modelo *Apoe*<sup>-/-</sup> (Yu *et al.*, 2012).

**OBJETIVOS**



Los objetivos planteados en esta tesis doctoral tienen como antecedentes diversos estudios que muestran la participación de los prostanoïdes en el proceso inflamatorio, con un papel esencial en múltiples patologías que cursan con un componente inflamatorio, entre las que se encuentran enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis. Por su parte, la activación de los macrófagos en el foco inflamatorio por distintos estímulos constituye un elemento clave en el progreso de la inflamación, contribuyendo a la producción de diversos mediadores inflamatorios entre los que se encuentran los prostanoïdes generados tras la acción de la COX-2.

De tal forma, el estudio de los estímulos que participan en la activación de macrófagos y en la regulación de la expresión de genes inflamatorios como la COX-2, resulta de gran interés para obtener nuevas evidencias sobre la participación de estos agentes en el proceso inflamatorio. Por otro lado, si bien diversos trabajos apuntan un papel esencial de los prostanoïdes y la COX-2 en la enfermedad vascular, no se conoce con claridad su contribución en el desarrollo de la aterosclerosis, existiendo estudios que describen tanto acciones beneficiosas como perjudiciales de éstos.

En base a estos antecedentes, los objetivos esenciales de esta tesis doctoral han sido:

1. Estudiar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la regulación de la expresión de la ciclooxigenasa 2 y de genes implicados en el proceso inflamatorio y determinar las vías de señalización implicadas.
2. Analizar el papel de la ciclooxigenasa 2 en la aterosclerosis mediante el análisis de diversos parámetros esenciales en el desarrollo de esta enfermedad en ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*.

## MATERIALES Y MÉTODOS





## I. MATERIALES

### 1. Modelos animales.

- **Ratones Cox-2<sup>-/-</sup>.** Ratones B6;129S7-*Ptgs2*<sup>tm1Jed</sup>/J procedentes de *The Jackson Laboratory*. La generación de estos animales se realizó mediante la sustitución de un fragmento de 1,8 kb, conteniendo el exón 1 del gen, por el gen para la Neomicina, impidiendo la correcta transcripción del gen de la Cox-2. Fondo genético 129SV/C57BL6 (Dinchuk *et al.*, 1995).
- **Ratones Apoe<sup>-/-</sup>.** Ratones C57/6J-*Apoe*<sup>tm1Unc</sup>/J adquiridos en *The Jackson Laboratory*. Modelo de ratón hipercolesterolémico debido a la ausencia de la apolipoproteína E (apoE). Adecuado para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Generan aterosclerosis con la edad, proceso que puede ser acelerado con dieta aterogénica. Fondo genético C57BL/6 (Piedrahita *et al.*, 1992)
- **Ratones Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>.** Generados en nuestro grupo, según se describe en el apartado de “Métodos”, mediante el cruce de las cepas B6;129S7-*Ptgs2*<sup>tm1Jed</sup>/J y C57/6J-*Apoe*<sup>tm1Unc</sup>/J para el estudio del desarrollo de la aterosclerosis en ausencia de COX-2.
- **Ratones controles (silvestres).** Animales de fondo genético C57BL/6 y 129SV/C57BL6 se usaron como controles de los ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>, respectivamente. Como controles de los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> se emplearon sus hermanos de camada *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>.

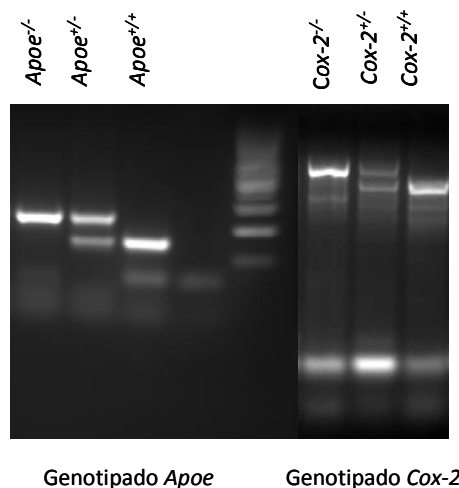
Estos animales han estado estabulados en el animalario del CBMSO, con nº de registro 28079-19A, el cual cuenta con un nivel de contención y bioseguridad adecuado de acuerdo a la legislación vigente. Todos ellos se mantuvieron alimentados a libre acceso, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad en el animalario. Los procedimientos realizados cuentan con el visto bueno del responsable de bienestar animal del CBMSO y la aprobación del comité de ética para la investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. Los investigadores responsables del proyecto y directores de la tesis doctoral, Dres. Manuel Fresno y Miguel A. Íñiguez, disponen de la certificación oportuna para la experimentación animal en las categorías B y C. En cuanto a la doctoranda, también cuenta con experiencia en manipulación de animales habiendo realizado el “Curso de capacitación para experimentación animal (categoría B)” acreditado por la Comunidad de Madrid, y organizado por el Gabinete Veterinario de la

UAM y los Vicedecanatos de Investigación de las Facultades de Ciencias y Medicina de la UAM, a finales de 2009.

### 1.1. Generación de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

Esta línea de ratones se obtuvo mediante el cruce de ratones de las cepas *ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>*, obtenidas de *The Jackson Lab*. Dado que las hembras *Cox-2<sup>-/-</sup>* son estériles, para la generación del modelo se realizaron cruce de machos *Cox-2<sup>-/-</sup> (ApoE<sup>+/+</sup>)* con hembras *ApoE<sup>-/-</sup> (Cox-2<sup>+/+</sup>)*, así como machos *ApoE<sup>-/-</sup> (Cox-2<sup>+/+</sup>)* con hembras *Cox-2<sup>-/-</sup> (ApoE<sup>+/+</sup>)* con el fin de asegurar la obtención de crías *Cox-2<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>+/-</sup>* y *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>+/-</sup>* en las camadas. El cruce de machos y hembras *Cox-2<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>+/-</sup>* permitió generar animales *Cox-2<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, que se cruzaron entre sí durante al menos 4 generaciones para asentar el silenciamiento del gen *ApoE* y obtener diferentes combinaciones de genotipo para el gen *Cox-2* (*Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, *Cox-2<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*). Para los diferentes ensayos realizados se utilizaron ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* de los obtenidos en las diferentes camadas.

El genotipado de los ratones se realizó mediante *PCR* de ADN genómico obtenido tras el procesamiento de tejido obtenido de las colas con el kit *Maxwell® 16 mouse DNA tail purification kit* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para el genotipado del alelo *Cox-2* fueron el 677 (5'-GTTACAATGTTCCAGACTCC-3' exón3 de *Cox-2*), 345 (5'-GTGAACTATGAAGTTAGGTCCTCTG-3' Intrón 2-entre exón1 y 2- de *Cox-2*) y el Neoas (5'-CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG-3' amplifica gen de la Neomicina, empleado para sustituir el de *Cox-2* en los ratones mutantes) para el alelo *Cox-2*. De esta manera, la combinación de Neoas+677 amplificarían un fragmento de 677 pb del alelo mutante, la de 345+677 un fragmento de 580 pb del alelo silvestre. La determinación de los ratones *Cox-2<sup>+/-</sup>* se determinaría por la aparición de ambas bandas. Para el alelo *ApoE* fueron el 01MR0180-(5'-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3' secuencia común), 01MR0181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3' secuencia reversa silvestre) y el 01MR0182 (5'-GCCGCCCCGACTGCATCT-3' secuencia reversa mutante). Así, se espera una banda de 245 pb en los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>*, una de 155 pb y otra de 245 pb para los ratones *ApoE<sup>+/-</sup>* y una de 155 pb para *ApoE<sup>+/+</sup>* (**Figura a**).



**Figura a. Análisis por PCR del genotipo de los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>.**

El genotipado de los genes *Apoe* y *Cox-2* se realizó mediante PCR de ADN genómico obtenido de las colas de los ratones, usando oligonucleótidos específicos. A la izquierda se muestra el genotipado para el alelo *Apoe* donde, en orden, encontramos las bandas correspondientes a *Apoe*<sup>-/-</sup>, *Apoe*<sup>+/-</sup> y *Apoe*<sup>+/+</sup>. A la derecha, se muestra el genotipado para *Cox-2*, mostrando de izquierda a derecha, las bandas resultantes para *Cox-2*<sup>-/-</sup>, *Cox-2*<sup>+/-</sup> y *Cox-2*<sup>+/+</sup>.

## 2. Cultivos celulares

### 2.1. Líneas celulares.

- **Líneas celulares de macrófagos de ratón RAW 264.7 y J774.**

Ambas líneas celulares se obtuvieron en origen de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera controlada con un 97% de humedad relativa y 7% de CO<sub>2</sub>, en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen Life Technologies) conteniendo 2 mM L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, gentamicina (1000 U/ml), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (SFB, BioWithaker). Los tratamientos de las células con diversos agentes pro-inflamatorios se realizaron en medio RPMI 1640 completo conteniendo un 2% de FB. La incubación de las células con inhibidores de las ciclooxygenasas o con inhibidores de señalización intracelular se llevó a cabo 45 minutos antes del tratamiento con el estímulo pro-inflamatorio.

- **Línea celular de monocitos humanos THP-1.**

Obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Las condiciones de cultivo de esta línea celular fueron las mismas que para las células RAW 264.7 o J774.

- **Línea celular de fibroblastos de ratón L929.**

Mantenida en medio DMEM completo suplementado con 10% SFB a 37°C y atmósfera controlada con un 97% de humedad relativa y 7% de CO<sub>2</sub>. Esta línea celular secreta al medio M-CSF, de modo que el sobrenadante de cultivo (LCM) se utiliza para la diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea. Para la obtención del LCM, se sembraron 500.000 células en 50 ml de DMEM 10% en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. A los 7 días de cultivo se recogió el medio, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras filtrado a través de un filtro de 0.45 µm se congeló a -20°C hasta su uso.

## **2.2. Cultivos primarios.**

- **Macrófagos peritoneales.**

Para la obtención de macrófagos peritoneales, se inyectó 1 ml de tioglicolato (10% p/v, DIFCO) en la cavidad peritoneal de cada ratón. Al cabo de 4 días, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y se extrajeron las distintas poblaciones celulares mediante lavado peritoneal con 10 ml de PBS frío. Se lisaron los hematíes con 2 ml de tampón de lisis durante 2 minutos en hielo. Para la purificación de los macrófagos adherentes, la mezcla heterogénea de células peritoneales se mantuvo en placas de cultivo durante al menos 2 horas, y después se retiraron las células no adheridas mediante lavados con PBS. Más de un 90 % de las células adheridas fueron identificadas como macrófagos, los cuales se mantuvieron en cultivo a 37° C en medio RPMI 1640 completo suplementado con un 5% de SFB.

- **Macrófagos residentes.**

Para la extracción de macrófagos residentes, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y se extrajeron las distintas poblaciones mediante lavado peritoneal con 10 ml de PBS frío. Después se procedió del mismo modo que para los macrófagos peritoneales, descrito anteriormente.

- **Macrófagos derivados de médula ósea.**

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. La médula ósea de los ratones se extrajo mediante el lavado del canal medular del fémur y de la tibia con PBS frío. De la suspensión celular obtenida se lisaron los hematíes con 2 ml de tampón de lisis durante 2 minutos en hielo y se mantuvo a 37°C en medio DMEM completo con un 10 % de SFB en placas de cultivo. Para la diferenciación de las células obtenidas a macrófagos, el medio se suplementó

con un 10% del sobrenadante de cultivo de células L929 (LCM) durante 7 días, cambiando el medio los días 3 y 6.

### 3. Soluciones, anticuerpos y reactivos.

#### 3.1. Tampones, medios de cultivo y tinciones.

Nombre	Composición
PBS	NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{12H}_2\text{O}$ 8 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1.5 mM
TBS	5M NaCl, 1M Tris pH 7.6
TBS-T	TBS, 0.1% Tween 20
Tampón lisis hematíes	$\text{NH}_4\text{Cl}$ , $\text{HKCO}_3$ , EDTA 0.1 M, pH 7.4
Tampón lisis proteínas Igepal (extractos totales)	50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Igepal-CA 630, 1 mM phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF), 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, aprotinina y pepstatina
Tampón A (ext. citosólicos y nucleares)	HEPES 10 mM pH 7.6, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, espermidina 0,75 mM, espermina 0,15 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ 10 mM y 5 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina y pepstatina
Tampón C (ext. citosólicos y nucleares)	HEPES 20 mM pH 7.6, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ 10 mM y 5 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina y pepstatina
Tampón de unión al ADN	polivinil etanol 2%, glicerol 2,5%, Tris pH 8 10 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM
Medio HBSS	Hank's balanced salt solution con 20 $\mu\text{M}$ de HEPES, $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$
RPMI 1640 completo	medio RPMI suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 100 U/ml penicilina, 1000 U/ml gentamicina, 2 mM L-glutamina y aminoácidos no esenciales
DMEM completo	medio DMEM suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 100 U/ml penicilina, 1000 U/ml gentamicina, 2 mM L-glutamina y aminoácidos no esenciales
Oil Red O (cortes y células espumosas)	Oil Red O (0,5% peso/volumen), Propilenglicol (100%). 26079-15- Electron Microscopy Sciences
Oil Red O ( <i>en face</i> )	0,07 g Oil Red O (O0625-Sigma), 25 ml Metanol, 10 ml NaOH 1M

### 3.2. Anticuerpos.

Especificidad	Características-Aplicación/Referencia	Origen
Cox-1 Ratón	Ac. Monoclonal-Western Blot (ALX-804-030)	Alexis Biochemicals
Cox-2 Humano	Ac. Monoclonal- Western Blot (ALX-804-112)	Alexis Biochemicals
Cox-2 Ratón	Ac. Monoclonal Purificado- Western Blot (610203)	BD Transduction
Cox-2 Ratón	Ac. Policlonal- Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia (160106)	Cayman Chemical
Cox-2 Ratón	Ac. Policlonal hecho en conejo (160106)- Inmunohistoquímica	Cayman
FP Ratón y Humano	Ac. Policlonal- Western Blot (101802)	Cayman Chemical
IgG Cabra	Ac. Acoplado a peroxidasa hecho en Conejo (A 5420)- Western Blot	Sigma-Aldrich
IgG Conejo	Ac. Acoplado a peroxidasa hecho en Cabra (1858415)- Western Blot	Pierce
IgG Conejo	Ac. Acoplado a Alexa 488 hecho en burro (A-21206)- Inmunofluorescencia	Invitrogen
IgG Ratón	Ac. Acoplado a peroxidasa hecho en Cabra (1858413)- Western Blot	Pierce
IgG-B	Ac. Secundario para Mac-3. Hecho en cabra (sc-2041)-Inmunohistoquímica	Santa Cruz
IL-6 Ratón	Ac. Policlonal- Western Blot (sc-1265-R)	Santa Cruz
iNOS Ratón	Ac. Policlonal- Western Blot (sc-650)	Santa Cruz
IκBα Ratón	Ac. Monoclonal- Western Blot (4814)	Cell Signaling
Mac-3 Ratón	Ac. Monoclonal hecho en rata (sc-19991)- Inmunohistoquímica	Santa Cruz
mPGES-1 Ratón	Ac. Policlonal- Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia (160140)	Cayman Chemical
NFATc2 Ratón	Ac. Policlonal hecho en conejo- Western Blot (672)	Dr. J.M. Redondo
plkBα Ratón	Ac. Monoclonal- Western Blot (9246)	Cell Signaling
RCAN1.4 Ratón	Ac. Policlonal- Western Blot (D6694)	Sigma-Aldrich

$\alpha$ -actina músculo liso Ratón	Ac. Monoclonal hecho en ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Detecta células musculares lisas (A5691)-Inmunohistoquímica	Sigma-Aldrich
$\beta$ -actina Ratón y Humano	Ac. Policlonal- Western Blot (sc-1616)	Santa Cruz

### 3.3. Reactivos.

Nombre	Características/Referencia	Origen
acLDL	LDLs acetiladas (L3486)	Invitrogen
acLDL fluorescentes	LDLs acetiladas y acopladas a Alexa Fluor 488 (L23380)	Invitrogen
Ang II	Angiotensina II humana (A9525)	Sigma-Aldrich
ApoA-I	Apolipoproteína A-I (178452)	Calbiochem
Avidin/Biotin Blocking Kit	Kit de bloqueo Avidina/Biotina para inmunohistoquímica (SP-2001)	Vector Labs
CAY10470	Inhibidor de la activación de NF-kB (10006734)	Cayman Chemical
CBA	Cytometric Bead Array (552364)	BD Biosciences
Celecoxib	Inhibidor de Cox-2	Lab. Esteve
colesterol-[ <sup>3</sup> H]	Colesterol conjugado con tritio (NET139259UC)	Perkin Elmer
CsA	Ciclosporina A. Inhibidor de calcineurina (239835)	Calbiochem
DAB	Diamino-bencidina (BUF021A)	AbD Serotec
dAMPc	Dibutiril-AMP cíclico (D-0260)	Sigma-Aldrich
DAPI	Marcador nuclear (268298)-Inmunofluorescencia	Merck
Dieta aterogénica	Dieta rica en grasa suplementada con 7,5g/kg colesterol. Ssniff EF M.	Ssniff
Elite vectastain ABC Kit	Kit de inmunohistoquímica (PK-6100)	Vector Labs

End I	Endotelina I humana (E7764)	Sigma-Aldrich
Eukitt	Medio de montaje no acuoso (03989)	Sigma-Aldrich
Fast Red	Fast Red TR/Naphthol AS-MX Phosphate (F4523)	Sigma-Aldrich
Fluprostenol	Agonista del receptor FP (16768)	Cayman Chemical
Formalina neutra tamponada 10%	Solución para fijación (HT501128)	Sigma-Aldrich
Glicerol-Gelatina	Medio de montaje acuoso (GG1)	Sigma-Aldrich
HDL	Colesterol HDL (437641)	Calbiochem
Ionóforo A23187	Ionóforo de Calcio (C7522)	Sigma-Aldrich
Ionomicina	Ionomicina de Calcio de <i>S.conglobatus</i> (I0634)	Sigma-Aldrich
JetPrime	Reactivo de transfección (114-15)	Polyplus transfection
LPS	Lipopolisacárido de <i>E.coli</i> (L8274)	Sigma-Aldrich
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2 (14010)	Cayman Chemical
PGE <sub>2</sub> EIA Kit	Kit de medición de PGE <sub>2</sub> (514010)	Cayman Chemical
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub> (16010)	Cayman Chemical
PMA	Éster de forbol (P1585)	Sigma-Aldrich
SuperSignal Substrate Detection System	Kit de revelado para Western Blot (34076)	Pierce
Tioglicolato	211716	BD Biosciences
TO901317	Agonista LXR (G6295)	Sigma-Aldrich
TRIZOL	Extracción de ARN (15596-018)	Invitrogen



#### 4. Oligonucleótidos.

##### 4.1. PCR convencional.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Origen
Cox-2 sense (r)	TTCAAAAGAAGTGCTGGAAAAGGT	Sigma-Aldrich
Cox-2 asense (r)	GATCATCTCTACCTGAGTGTCTTT	Sigma- Aldrich
$\beta$ -actina sense (r)	CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC	Invitrogen
$\beta$ -actina sense (r)	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	Invitrogen
Cox-2 sense (h)	TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT	Invitrogen
Cox-2 asense (h)	AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT	Invitrogen
GAPDH sense (h)	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA	Invitrogen
GAPDH asense (h)	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	Invitrogen

(h) humano; (r) ratón

##### 4.2. PCR cuantitativa.

Nombre	Referencia	Origen
18S	Hs99999901_s1	Applied Biosystems
ABCA1 (r)	Mm01350760_m1	Applied Biosystems
ABCG1 (r)	Mm0134820_m1	Applied Biosystems
apoE (r)	Mm00432403_m1	Applied Biosystems
CD11c (r)	Mm00498698_m1	Applied Biosystems
CD4 (r)	Mm00442754_m1	Applied Biosystems
CD68 (r)	Mm00839636_m1	Applied Biosystems
CD8 (r)	Mm01182107_g1	Applied Biosystems
Cox-2 (h)	Hs00153133_m1	Applied Biosystems
Cox-2 (r)	Mm00478374_m1	Applied Biosystems

Foxp3 (r)	Mm00475156_m1	Applied Biosystems
IFN $\gamma$ (r)	Mm00801778_m1	Applied Biosystems
IL-2 (r)	Mm00434256_m1	Applied Biosystems
IL-6 (r)	Mm00446190_m1	Applied Biosystems
iNOS (r)	Mm 00440485_m1	Applied Biosystems
LDLr (r)	Mm00440169_m1	Applied Biosystems
LXR $\alpha$ (r)	Mm0043451_m1	Applied Biosystems
MCP-1 (r)	Mm99999056_m1	Applied Biosystems
mPGES-1 (h)	Hs00610420_m1	Applied Biosystems
mPGES-1 (r)	Mm00477214_m1	Applied Biosystems
PPAR $\gamma$ (r)	Mm01184322_m1	Applied Biosystems
SR-A (r)	Mm00446214_m1	Applied Biosystems
TNF $\alpha$ (r)	Mm00443258_m1	Applied Biosystems
$\beta$ -actina	Mm00607939_s1	Applied Biosystems

## 5. Plásmidos.

### 5.1. Plásmidos reporteros.

- Cox2-luc (pPGHS-2 Medium): Contiene el promotor básico desde la región -2100 a la +88 desde el origen de transcripción del gen Cox-2 de ratón en el plásmido pxP2. Dr. S. Vogel (Maryland, Baltimore, USA) (Vogel *et al.*, 2000)

- NFAT-luc: Contiene tres copias en tándem de la secuencia correspondiente al sitio distal de unión de NFAT al promotor de IL-2 (elemento ARRE2) fusionado al promotor mínimo (-72/+47) del gen IL-2 (Durand *et al.*, 1988). Este plásmido nos fue amablemente cedido por el Dr. G.R. Crabtree (Universidad de Stanford, Estados Unidos).

- pGAL4 5x luc: Incluye cinco repeticiones de la secuencia de reconocimiento por el dominio de unión al ADN de la proteína de levadura GAL4 en la región reguladora previa al gen de la luciferasa (Minden *et al.*, 1995).

## 5.2. Plásmidos de expresión.

- pcDNA3: vector de clonaje para la expresión de proteínas en eucariotas bajo la regulación del promotor del citomegalovirus (CMV) (Invitrogen).
- pSVL/FLAG-hFP-R: plásmido de expresión de hFP-Flag (proteína de fusión entre el epítipo Flag y el receptor FP de humano) (Neuschäfer-Rube *et al.*, 2003). Este plásmido nos fue cedido por el Dr. F. Neuschäfer-Rube (Universidad de Potsdam, Alemania).
- NFATDN: expresa una forma truncada de NFATc1 que actúa como dominante negativo de la activación de proteínas NFAT, interfiriendo con su paso al núcleo (pSH102CΔ418). Cedido por el Dr. G. Crabtree (Northrop *et al.*, 1994).
- pGAL4-h-NFATc2 (1-415): expresa una proteína quimérica formada por el dominio transactivador amino terminal (del aa 1 al 415) de NFATc2 humano, fusionado al dominio de unión al ADN de la proteína GAL4 (de Gregorio *et al.*, 2001).

## II. MÉTODOS.

### 17. Transfección transitoria y actividad luciferasa.

La actividad transcripcional de las distintas secuencias promotoras acopladas al gen de la luciferasa, se analizó mediante transfección transitoria en células RAW 264.7 de los plásmidos correspondientes con el reactivo jetPRIME™ (Polyplus transfection) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se transfectaron con cantidades variables de ADN, entre 0,5 y 1 µg por 500.000 células, para lo cual se utilizaron 2,25 µl de jetPRIME.

Las células se incubaron con la mezcla ADN-jetPRIME durante 4 horas, en medio RPMI 0,5% SFB sin antibióticos y a 37°C. Tras este tiempo, las células se trataron con los diferentes estímulos en RPMI 2% SFB sin antibióticos durante 6 o 18h, y se lisaron con 40 µl de tampón de lisis comercial (*Luciferase Assay System*, Promega). La actividad luciferasa de la muestra se determinó en un luminómetro “Monolight 2010” (Analytical Luminiscence Laboratory) tras la incubación de 20 µl de lisado con luciferina. Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a la cantidad de proteína presente en los lisados celulares determinada mediante un ensayo BCA (PIERCE). Todos los experimentos de transfección se realizaron al menos tres veces, realizándose triplicados

de cada punto experimental en cada uno de ellos. Los resultados son presentados como Veces de Inducción ( $RLUs_{\text{muestra}} / RLUs_{\text{basal}}$ ).

## 18. Análisis de la expresión génica mediante *RT-PCR*.

El aislamiento del ARN total de las células de cultivos primarios y de tejidos se realizó utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen), mientras que para la extracción de ARN total de células RAW 264.7 y THP-1 se empleó el Kit *Absolutely RNA Miniprep Kit* (Stratagene), en ambos casos siguiendo las instrucciones del proveedor. La obtención de ADNc se realizó por transcripción reversa a partir de 1 µg de ARN total (*MuLV Reverse Transcriptase*, Roche). Este ADNc se sometió a amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*AmpliTaq DNA Polimerase*, Roche), usando oligonucleótidos específicos anteriormente descritos. Las muestras se amplificaron durante 30-35 ciclos, según el gen a analizar, que consistían en: 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de anillamiento a 55-65°C y 45 segundos de amplificación a 72°C. El producto de la PCR se visualizó mediante su separación en geles de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

Para el análisis de la actividad transcripcional mediante *RT-PCR* cuantitativa a tiempo real, el ARNm se retrotranscribió mediante la utilización del kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), y se amplificó usando el kit *Taqman Universal PCR Master Mix* con sondas *Taqman MGB* gen-específicas en un aparato de PCR “ABI PRISM 7900HT” (Applied Biosystems). La cuantificación de la expresión de ARNm se realizó comparando el ciclo umbral de expresión ( $\Delta\Delta Ct$ ) de las muestras con respecto al basal, siguiendo las instrucciones del fabricante (*SDS 2.1 software*, Applied Biosystems). Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado y normalizadas por la expresión de los genes endógenos 18S,  $\beta$ -actina o GAPDH. En las gráficas los datos están expresados en forma de RQ o Log RQ (*Relative quantification*).

El análisis de actividad transcripcional mediante *array* se realizó empleando una tarjeta *Taqman* de baja densidad (TLDA) de Applied Biosystems. Esta tarjeta fue diseñada para analizar mediante *RT-PCR* cuantitativa hasta 96 genes. La relación de genes analizados se encuentra en el apartado de “Material suplementario” de esta tesis. La cuantificación de la expresión de ARNm se realizó en las instalaciones del Parque Científico de Cantoblanco por el servicio de genómica. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el software *RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis version 3.5*.

## 19. Inmunodetección de proteínas (*Western Blot*).

La obtención de extractos celulares totales se realizó mediante la lisis de las células en tampón *Igepal frío*. Para la obtención de los extractos en los cuales se analizó la fosforilación de proteínas, se añadieron inhibidores de fosfatasas al tampón de lisis ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM, y NaF, 1 mM). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual se obtuvieron los extractos proteicos totales por centrifugación. La cantidad total de proteína en la muestra se determinó mediante un ensayo BCA (PIERCE). De cada muestra, se tomaron 20-30 µg de proteína a los que se añadió tampón de carga a un volumen equivalente (2% SDS, 10% glicerol, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.7, 5% 2-mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol), se hirvieron durante 5 minutos y se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Tras la electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Trans-blots transfer medium* (BioRad) en cámara húmeda con Tris-glicina 20% (v/v) metanol. Esta membrana se bloqueó en una solución de TBS-T con leche desnatada en polvo al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual, se incubó con el anticuerpo primario, a la dilución indicada por el fabricante o determinada empíricamente en el laboratorio, durante 18 horas a 4°C en solución de bloqueo. Después, se lavó la membrana con TBS-T y se incubó en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico acoplado a peroxidasa, diluido 1/1000 en solución de bloqueo. Tras dos lavados con TBS-T y uno con TBS, las bandas se visualizaron mediante el método de quimioluminiscencia *SuperSignal Substrate Detection System* (Pierce) y exposición de películas autorradiográficas. Posteriormente, las bandas obtenidas se densitometraron en un "GS-800 Calibrated Densitometer" (BIO-RAD) con el programa *Quantity One 4.6.3*.

## 20. Obtención de extractos citosólicos y nucleares.

El análisis mediante *Western Blot* de la expresión de los diferentes NFATs, así como la realización de ensayos de retardo de la movilidad electroforética, requirió el aislamiento de las fracciones citosólicas y nucleares de células RAW 264.7. Las células se lisaron en tampón A frío durante 15 minutos a 4° C. Posteriormente, se añadió a la muestra 25 µl de *Igepal* al 10%, se agitó y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se recuperó como extractos citosólicos, mientras que el precipitado, constituido por los núcleos celulares, fue lisado en 50 µl de tampón C durante 20 minutos, a 4° C y en agitación continua. La fracción nuclear se obtuvo tras la

posterior centrifugación a 14000 rpm, durante 10 minutos y a 4°C. La cuantificación de proteína en ambos extractos fue determinada mediante el método de Bradford (Bio-Rad).

## **21. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).**

Los extractos nucleares (5 µg) se incubaron con 1 µg de poli (dI-dC) en tampón de unión a ADN, durante 10 min a 4°C. A esta mezcla se añadieron 50.000 cpm del oligonucleótido de doble cadena marcado con <sup>32</sup>P y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. En los experimentos de competición, se añadió a la mezcla de reacción una concentración del oligonucleótido sin marcar radiactivamente 50 veces superior a la del oligonucleótido marcado. Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 4,5% en 0,4x Tris-Borato-EDTA (TBE) durante 3 horas a 200 voltios. Posteriormente fueron secados al vacío a 80°C, revelados por autorradiografía y las bandas fueron cuantificadas en un bioanalizador *Fosforimager FUJIFILM BAS 1500*. Para la generación del oligonucleótido de doble hebra que contiene el elemento de respuesta a estudiar, los oligonucleótidos de hebra simple correspondientes se anillaron durante 10 minutos a 65°C, seguido de una incubación durante dos horas a temperatura ambiente. El marcaje del oligonucleótido de doble hebra (sonda), se realizó con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P dATP utilizando la T4 polinucleótido quinasa. La sonda marcada se purificó mediante la utilización de columnas Sephadex G25, equilibradas previamente con tampón Tris-EDTA (TE). Las secuencias (5'-3') de los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-gatcGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT-3' y el correspondiente oligonucleótido complementario, correspondientes al sitio NFAT distal del promotor de la IL-2 humana.

## **22. Análisis de la movilización de calcio intracelular.**

Las células RAW 264.7 (10<sup>6</sup> células por punto) se trataron con los diferentes estímulos en buffer HBSS (suplementado con Ca<sup>2+</sup>) y se incubaron con las sondas fluorescentes sensibles al Ca<sup>2+</sup>, Fura Red (10 µM) y Fluo-3 (4 µM) durante 30 minutos en oscuridad y agitación. Además de las muestras experimentales, se usaron diferentes controles como células sin incubar con las sondas como control negativo y células incubadas con Fura Red y Fluo-3 por separado. Una vez cargadas las células con las sondas, se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS Canto (BD). Justo antes de medir, cada

muestra se atemperó 5 minutos en un baño a 37°C. Cada muestra se pasó por el citómetro durante tres minutos en total: durante el primer minuto se pasó la muestra sin estímulo alguno y a continuación se añadió el estímulo correspondiente tras lo que se miden los cambios de fluorescencia durante 2 minutos. Los resultados se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.). La medida de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se determinó mediante el análisis de la relación entre la fluorescencias Fluo-3 (excitación 488nm; emisión 530 nm) y Fura-RED (excitación 488nm; emisión 597nm).

### 23. Inmunofluorescencia.

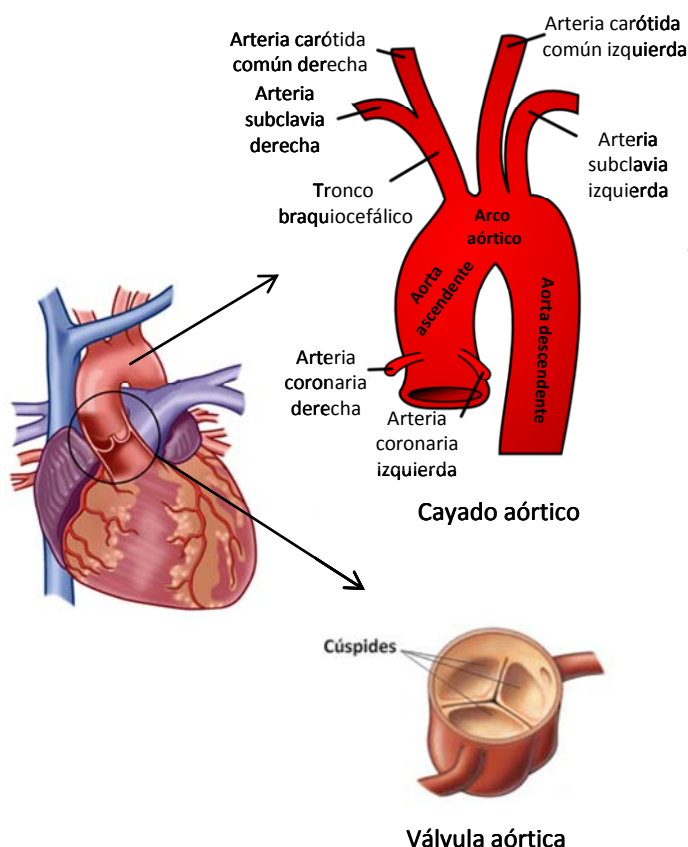
La localización subcelular de NFATc2 se realizó mediante inmunofluorescencia para su posterior análisis mediante microscopía. Las células se crecieron hasta un 50% de confluencia sobre cubreobjetos tras lo cual se sometieron a los diferentes tratamientos durante el tiempo indicado. Se realizaron lavaron con PBS, tras lo cual las células se fijaron y permeabilizaron con metanol absoluto a -10°C durante 5 minutos. Posteriormente, se dejaron secar y se eliminó la autofluorescencia de las células mediante la incubación de los cubreobjetos en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mM) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se bloquearon con tampón PBS 1% BSA durante 10 minutos. Se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo primario NFATc2, para posteriormente, tras varios lavados con PBS, incubarse durante 1 hora con su correspondiente anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Para el montaje de los cubreobjetos con Mowiol se lavaron las muestras en PBS y agua destilada, y se deshidrataron los cubreobjetos con etanol al 70 %. La tinción de los núcleos celulares, previa al montaje, se realizó incubando las muestras con DAPI (Invitrogen). Las imágenes se capturaron en el microscopio "Confocal Radiance 2000" y se analizaron con el software *Image J 1.36b* (National Institutes of Health, USA).

### 24. Medición de prostaglandinas.

La cuantificación de la producción de prostaglandinas se realizó mediante inmuno-ensayos competitivos *PG EIA kit* (Cayman Chemical), en sobrenadantes recogidos de macrófagos cultivados *in vitro*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 25. Generación de aterosclerosis.

Se usaron hembras de 16 semanas de ratones  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$  y  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$  a las que se les administró una dieta aterogénica (10,8% grasa total, 0,75% colesterol; S8492-E010, Ssniff) durante 5 o 10 semanas. Antes y después del periodo de dieta, se extrajo sangre para la obtención de suero y se llevó un control semanal del peso de los ratones. Tras finalizar el periodo de dieta, los animales se sacrificaron y se realizó la extracción de tejidos. El corazón se utilizó para cortes histológicos mientras que la aorta se empleó para extracción de ARN y análisis de las lesiones ateroscleróticas *en face*. El hígado, el bazo y el riñón se congelaron para la posterior extracción de ARN. Los macrófagos residentes, derivados de médula ósea y los macrófagos peritoneales se utilizaron para ensayos de captación de acLDL, generación de células espumosas, experimentos de flujo de colesterol o extracción de ARN y proteína. La localización de las zonas de la aorta que se emplearon para el análisis *en face* y para la realización de cortes histológicos y posterior análisis de la lesión, se muestra en la **figura b**.



**Figura b. Esquema de la ubicación de las zonas de la aorta analizadas.**

En la región del cayado aórtico se usaron cortes longitudinales para el análisis *en face*. La zona de la válvula aórtica y la región de la aorta ascendente se analizaron mediante la realización de cortes histológicos, comenzando desde las válvulas, hasta llegar a la aorta ascendente en secciones seriadas de 7  $\mu$ m de grosor.



## 26. Análisis de las lesiones ateromatosas en la aorta.

### *Análisis en face*

Se extrajeron aortas hasta su anclaje en el corazón, que fueron perfundidas para eliminar restos de sangre, además de proceder a su limpieza de restos de otros tejidos bajo lupa (M56 Leica). Las aortas se fijaron en formalina al 10% durante 24h a 4°C tras lo cual se procedió a su tinción con Oil Red O (ORO. O0625 Sigma) durante 1 hora en agitación orbital suave. Una vez teñidas, y tras tres lavados en metanol 78%, la aorta se conservó en PBS con 1% de azida sódica a 4°C. Posteriormente se abrió longitudinalmente y se fotografió con una cámara acoplada a la lupa (Cámara digital réflex EOS 450D Canon) y las imágenes se analizaron con el programa *Image J 1.36b* (National Institutes of Health, USA). Los resultados se expresan como porcentaje del área de la lesión respecto al área total de la aorta. La lesión presente en el cayado aórtico y la lesión de la aorta torácica se analizaron por separado.

### *Tinción de cortes histológicos*

Los corazones conteniendo la aorta proximal de los ratones, se embebieron en medio de conservación *TissueTek* (Sakura), y mediante criostato, se obtuvieron secciones transversales y seriadas de 7  $\mu\text{m}$  de grosor, empezando desde la zona de válvulas aórticas y acabando en el inicio de la aorta ascendente (**Figura b**). La detección de acúmulos lipídicos en ambas regiones se realizó de la siguiente manera: los cortes se fijaron con formalina 10% tamponada (Sigma) durante 10 minutos. Después de lavar con agua destilada, se introdujeron en propilenglicol 100% (ACROS Organics) durante 2 minutos. A continuación se realizó la tinción con Oil Red O (Electron Microscopy Sciences) durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, los cortes se introdujeron en propilenglicol 85% agua destilada durante 1 minuto. Se realizaron dos lavados con agua destilada y se procedió a la contratinción con hematoxilina de Harris diluida en agua (2:1) durante 2 minutos. Los cortes se lavaron dos veces en agua y se procedió al montaje en glicerol/gelatina (Sigma). Se tomaron fotos de las muestras con una cámara CCD en un microscopio con objetivos de 5 y 10 aumentos. La cuantificación de la superficie teñida con respecto al total del área ocupada por la aorta fue realizada con el software *Image J 1.36b* (National Institutes of Health, USA) en al menos 3 cortes a tres alturas diferentes de cada una de las zonas analizadas para cada ratón.

## 27. Inmunohistoquímica.

Se emplearon cortes congelados seriados de la zona de válvulas aórticas procedentes de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* para estudiar la expresión de diferentes marcadores. Las secciones se fijaron con acetona y se lavaron con PBS antes de incubar con solución de bloqueo (PBS con 10% de suero de caballo o de cabra) durante 30 minutos. Tras lavar con PBS, se incubaron con *Avidin/Biotin Blocking Kit* (Vector Laboratories) según instrucciones del fabricante. Las secciones se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (anti-COX-2 o anti-mPGES-1) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora. A continuación se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos diluido en PBS con 2% de suero de ratón. Tras este tiempo, las secciones se volvieron a lavar, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena del tejido con  $H_2O_2$  al 1% en PBS durante 30 minutos y se incubaron con avidina acoplada a peroxidasa (*Vectastain ABC kit*, Vector Laboratories, Inc) durante otros 30 minutos. El revelado de las muestras se realizó con diaminobencidina (DAB) siguiendo las instrucciones del kit *Peroxidase Substrate DAB kit* (Vector Laboratories, Inc). Los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina para incrementar el contraste del tejido. Los cortes se deshidrataron mediante incubación con porcentajes crecientes de alcohol y se montaron con Eukitt.

En el caso de la tinción con el anticuerpo anti- $\alpha$ -actina, al estar conjugado con fosfatasa alcalina se procedió directamente con el revelado con *Fast Red* (Sigma). Los cortes se montaron en medio acuoso con glicerol/gelatina.

La detección de los precipitados de DAB o Fast Red, se realizó en un microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD (Leica) para la captura de imágenes. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software *Image J 1.36b* (National Institutes of Health, USA).

## 28. Ensayo de captación de LDL acetiladas (acLDL).

Los macrófagos residentes o derivados de médula de ratones (800.000 por punto) procedentes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* o *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* alimentados con dieta aterogénica se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de acLDL marcadas con Alexa 488 (Invitrogen) en medio RPMI o DMEM completo sin suero durante 2-3 horas, en placas de 6 pocillos.

Pasado este tiempo, se recogieron las células, se fijaron en PBS con 1% de formaldehído y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo.

### 29. Generación de células espumosas.

La generación de células espumosas se llevó a cabo a partir de macrófagos residentes procedentes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* o *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, incubados durante 24h con 25 µg/ml de LDLs acetiladas (Invitrogen). Se usaron 300.000 macrófagos por punto sembrados en placas de 24 pocillos en las que previamente se introdujo un cubreobjetos circular. La generación de células espumosas se analizó mediante la tinción de lípidos Oil Red O (Electron Microscopy Sciences). Los cubreobjetos se montaron en el medio acuoso de glicerol/gelatina sobre portaobjetos para su análisis por microscopía y obtención de fotografías.

### 30. Ensayo de medida de flujo de colesterol.

Los macrófagos peritoneales (80.000 por punto) se incubaron con 0,5 µCi/ml colesterol-[<sup>3</sup>H] en placas p12 o p24 y medio RPMI o DMEM completo con 2% SFB, durante 48h a 37°C y 7% CO<sub>2</sub>. Después de dos días, se retiró el medio con colesterol tritado y se sustituyó por medio completo sin suero durante 18h. Por último, se cambió el medio por medio completo sin suero suplementado al que se le añadieron aceptores de colesterol: 10 µg/ml de apoA-I (Calbiochem) o 20 µg/ml de HDL (Calbiochem). Después de 4-6 horas con los aceptores, se recogió el sobrenadante y se midió en un contador de centelleo (RACKBETA 1209, Wallac). Las células se recogieron con agua y se midió la radiactividad presente en las mismas. Los resultados se expresan como porcentaje de flujo de colesterol calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{flujo colesterol} = \frac{\text{Cts sobrenadante} * \text{FD}}{(\text{Cts sobrenadante} * \text{FD}) + (\text{Cts células} * \text{FD})} * 100$$

Cts: cuentas

FD: factor de dilución

A los valores obtenidos se les resta el porcentaje de flujo de colesterol obtenido en los pocillos en los que no se añadieron aceptores.

### 31. Medición de colesterol, triglicéridos y citoquinas en suero.

Los niveles de colesterol total, colesterol de baja densidad (LDL) y colesterol de alta densidad (HDL), presentes en el suero de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* se midieron con el kit *HDL, LDL/VLDL Cholesterol Assay Kit* (ab65390 Abcam). Los niveles de triglicéridos totales en muestras de suero de los mismos animales se realizaron mediante el kit de determinación de triglicéridos de Cayman (10010303). En ambos casos se siguieron las instrucciones incluidas en el kit.

La producción de citoquinas en los sueros de los ratones se determinó por citometría de flujo mediante un ensayo *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse/Rat Soluble Protein Master Kit* (Becton Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 32. Análisis estadístico.

Los datos presentados en el apartado “Resultados” están expresados como la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos en muestras ensayadas por duplicado o por triplicado. Los datos han sido analizados con el software *Graphpad Prism 5*. En poblaciones múltiples con diferentes medias se analizó la varianza de las mismas mediante el test ANOVA de 1 rama o dos, y se compararon las medias mediante el test de Bonferroni. Además, se realizó el test t-Student para comparar dos poblaciones entre sí. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS



## I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR CALCIO EN MACRÓFAGOS.

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental en numerosos procesos biológicos tanto en células animales como en vegetales. El  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar sobre las vías de transducción de señales en el interior celular gracias a la activación de canales de iones, que permiten su entrada, o como un segundo mensajero como resultado de la activación de receptores tales como los GPCRs. Como consecuencia, se desencadenan numerosas reacciones bioquímicas y respuestas fisiológicas por parte de las células (Dedkova EN, 2000), incluyendo la regulación de la transcripción génica a través de sus efectos sobre la actividad de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y NFAT (Brown *et al.*, 2004). Tanto NF- $\kappa$ B como NFAT, tienen un papel central en la respuesta inmune, puesto que regulan la transcripción de genes que codifican para otros factores de transcripción, proteínas de señalización, citoquinas, receptores de superficie y otras proteínas efectoras. Aunque la regulación de la transcripción génica dependiente de NF- $\kappa$ B ha sido muy estudiada en macrófagos, no ocurre lo mismo con la dependiente de NFAT, si bien trabajos recientes apuntan a un papel de este factor de transcripción en la fisiología de células mieloides como macrófagos y células dendríticas (Fric *et al.*, 2012; Zanoni y Granucci, 2012).

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar la influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la expresión génica en macrófagos, analizando el posible papel de la vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ /Cn/NFAT. En primer lugar, se estudió la influencia de esta vía de señalización sobre la expresión de COX-2 en macrófagos. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado el papel de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  y la consecuente activación de NFAT sobre la regulación de COX-2 en linfocitos T, células endoteliales y de carcinoma de colon (Duque *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2001; Íñiguez *et al.*, 2000). Sin embargo, la participación de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de COX-2 en macrófagos no ha sido descrita en detalle hasta la fecha.

### 4. El incremento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular induce la expresión de COX-2 en macrófagos.

La expresión de COX-2 en macrófagos, además de otros tipos celulares, es inducida, entre otros estímulos, por agentes proinflamatorios como ésteres de forbol, LPS, la IL-1 $\beta$  o el TNF $\alpha$  (Huang *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 1995). En la inducción de COX-2 en respuesta a estos estímulos participan diferentes vías de señalización que median la activación de diversos factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, c/EBP, CREB,

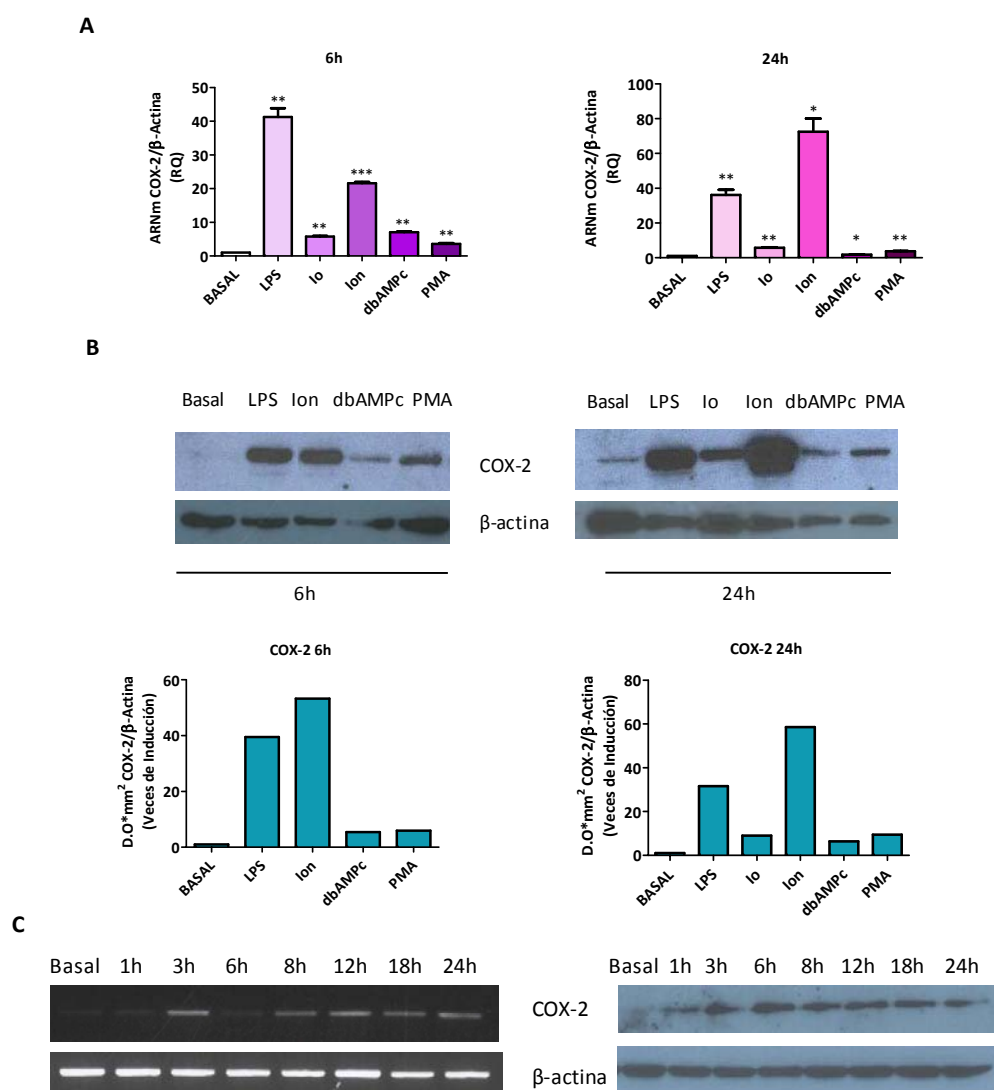
NFAT o AP-1 (Iniguez *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2006; Tsatsanis *et al.*, 2006; Wadleigh *et al.*, 2000).

Con el fin de estudiar la regulación de COX-2 en macrófagos, se trataron las células RAW 264.7, línea celular de macrófagos de ratón, con diferentes estímulos. Además de activadores conocidos de la expresión de COX-2 en macrófagos como el LPS, el PMA y el dbAMPc, se analizó el efecto del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mediante la utilización de ionóforos de calcio como la ionomicina (Io) y el ionóforo A23187 (Ion), sobre los niveles de ARNm de COX-2 por *RT-PCR* cuantitativa tras 6 horas o 24 horas de tratamiento. Como se muestra en las gráficas de la **figura 1A**, el tratamiento con LPS produjo una inducción del orden de 40 veces en los niveles de ARNm de COX-2 apreciable a las 6 h y que se mantiene tras 24 h de tratamiento. Las inducciones por otros agentes inductores de la expresión de COX-2 como el PMA o el dAMPc fueron en todo caso menores, y disminuyeron a las 24 h de tratamiento. Por su parte, el Ion promovió una fuerte inducción de la expresión de COX-2 evidente a las 6 h y que aumentó hasta 70 veces a 24 h. La Io también fue capaz de inducir la expresión de COX-2 en estas células, si bien en unos niveles menores (del orden de 5 veces).

El análisis de los niveles de proteína de COX-2 realizado mediante *Western blot*, confirmó los resultados obtenidos mediante RT-PCR. De tal forma, el LPS produjo una inducción notable de la expresión de COX-2 mientras que la inducción en respuesta a dAMPc o PMA, aunque evidente, fue sustancialmente menor. Así mismo, los resultados del *Western blot* confirman la capacidad de los ionóforos de calcio para inducir la expresión de COX-2 en células RAW 264.7, siendo el Ion mucho más efectivo que la Io, tanto a 6 como a 24 h (**Figura 1B**). El análisis de la inducción de la COX-2 por Ion a diferentes tiempos de estimulación puso de manifiesto la inducción temprana de la misma, observándose un incremento notable ya a las 3 horas, tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figura 1C**).

A continuación, se determinó el efecto de los diferentes estímulos en la línea celular de monocitos humana THP-1, así como en macrófagos peritoneales de ratón obtenidos tras tratamiento con tioglicolato. El análisis de los niveles de ARNm en células THP-1 muestra que tanto el LPS, en mayor medida, como el dAMPc o el PMA, fueron capaces de promover la inducción de la expresión de COX-2. Destaca la inducción de COX-2 en respuesta al tratamiento con Ion, alcanzando unos niveles mucho mayores que con el resto de estímulos tanto para el ARNm como para la proteína (**Figuras 2A y 2B**). En macrófagos peritoneales de ratón el tratamiento con Ion también produjo un

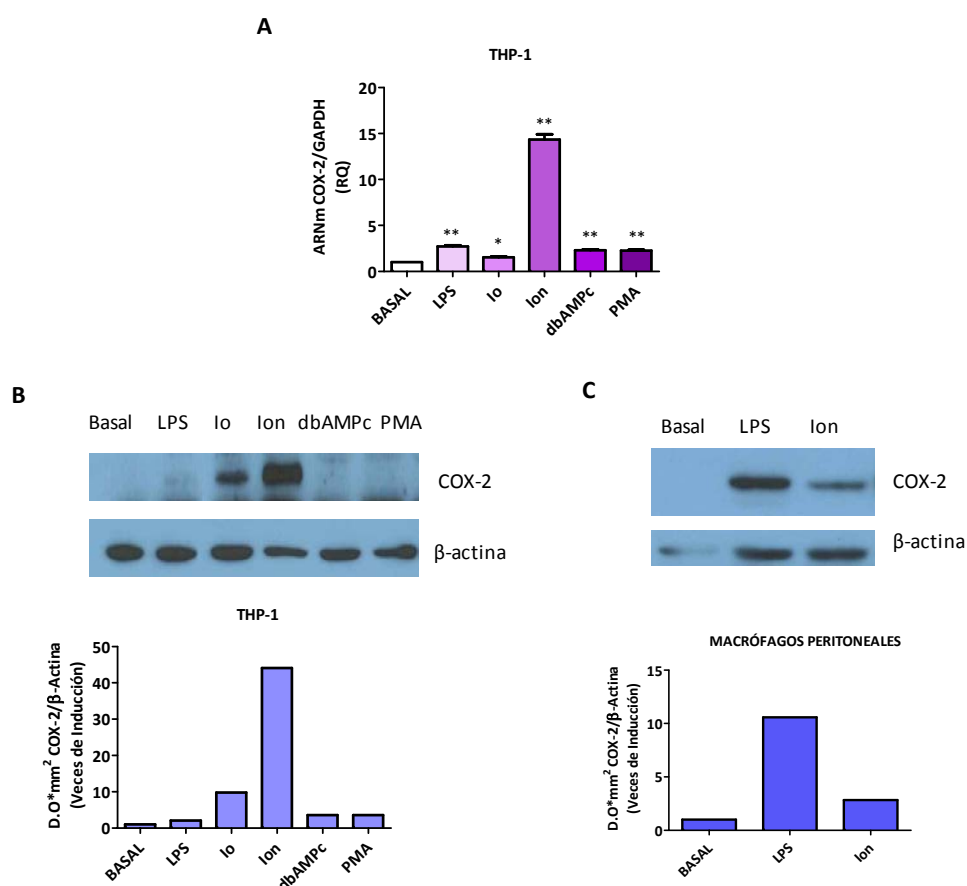
aumento en la expresión de COX-2, aunque menor que el producido por el LPS (**Figura 2C**).



**Figura 1. Inducción de la expresión de COX-2 en células RAW 264.7.**

Las células RAW 264.7 se estimularon durante 6h o 24h con LPS (2 µg/ml), ionomicina (Io) (500 ng/ml), ionóforo A23187 (Ion) (0,5 µM) dbAMPc (100 µM) y PMA (20 ng/ml) (**A y B**). En **C** se trataron con Ion (0,5 µM) durante 1h, 3h, 6h, 8h, 12h y 24h. **A**. Análisis de los niveles de ARNm de COX-2 por *RT-PCR* cuantitativa tras 6h (izquierda) o 24h (derecha) de tratamiento con los estímulos indicados. Los resultados se expresan como la media de RQ ± SD respecto al basal y normalizados por la expresión de β-actina. \*p<0.05; \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al basal. **B**. *Western blot* mostrando la expresión de COX-2, y de β-actina como control, tras 6h (izqda.) o 24h (dcha.) de tratamiento con los estímulos indicados. En el panel inferior se muestra su análisis densitométrico en veces de inducción respecto al basal, tras la normalización de los niveles de proteína COX-2 con respecto a los de β-actina. **C**. Se muestra una cinética de inducción de COX-2 por Ion en células RAW 264.7. Los niveles de ARNm se analizaron mediante *RT-PCR* convencional (izquierda) y los de proteína mediante *Western Blot* (derecha). Como control, se analizaron los niveles de ARNm y de proteína de β-actina. En todos los casos se muestra los resultados de un experimento representativo.





**Figura 2. Inducción de la expresión de COX-2 en células THP-1 y en macrófagos peritoneales de ratón.**

Las células se trataron durante 18h con LPS (2 µg/ml), ionomicina (Io) (500 ng/ml), ionóforo A23187 (Ion) (0,5 µM), dbAMPc (100 µM) o PMA (20 ng/ml) según se indique. **A.** Análisis por *RT-PCR* cuantitativa de los niveles de ARNm de COX-2 en células THP-1. Los datos están expresados como media de RQ ± SD con respecto al basal y corregidos por los valores obtenidos para la expresión del gen control GAPDH. \*p<0.05. \*\*p<0.01 respecto al basal. **B y C.** Análisis de la expresión de COX-2 mediante *Western Blot* en extractos obtenidos de células THP-1 (**B**) o de macrófagos peritoneales de ratón (**C**) tras los diferentes tratamientos. Como control, se muestran los niveles de β-actina. La densitometría de las bandas obtenidas en los *Western blots* en veces de inducción respecto al basal, tras la normalización de los niveles de proteína COX-2 con respecto a los de β-actina, se muestra en los paneles inferiores.

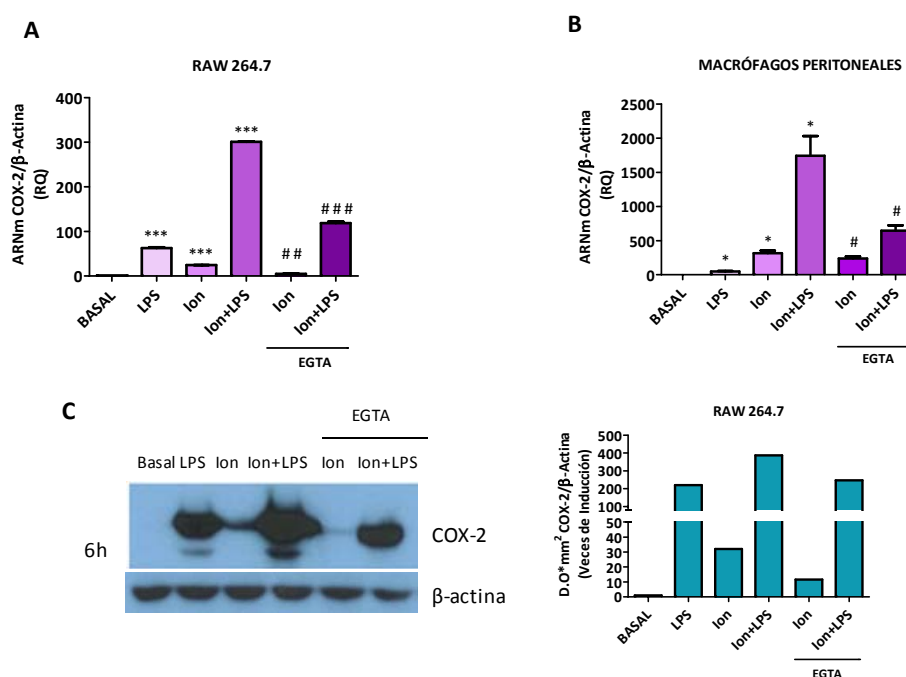
### 1.1. Cooperación entre la activación por LPS y el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular en la inducción de expresión de COX-2.

Los resultados anteriores mostraban que tanto la activación con LPS como el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular producían un notable incremento de la expresión de COX-2 en macrófagos. Por ello analizamos el efecto del tratamiento combinado de ambos estímulos sobre la expresión de COX-2. Como se muestra en las figuras **3A y 3C**, el

tratamiento con Ion+LPS tuvo un efecto cooperativo sobre la inducción de COX-2, observándose un aumento en los niveles de ARNm y de proteína mucho mayor que el producido en respuesta a cada estímulo por separado.

Con el fin de corroborar que el efecto observado tras el tratamiento con Ion, ya fuera por sí mismo o en combinación con el LPS, tenía relación directa con el incremento de calcio intracelular promovido por este agente, se realizaron los diferentes tratamientos en presencia de un compuesto quelante de iones  $\text{Ca}^{2+}$  como el EGTA. La presencia de EGTA en el medio produjo un descenso significativo de la inducción de la expresión de COX-2 en respuesta al tratamiento con Ion, ya fuera sólo o en combinación con LPS, tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figuras 3A y 3C**).

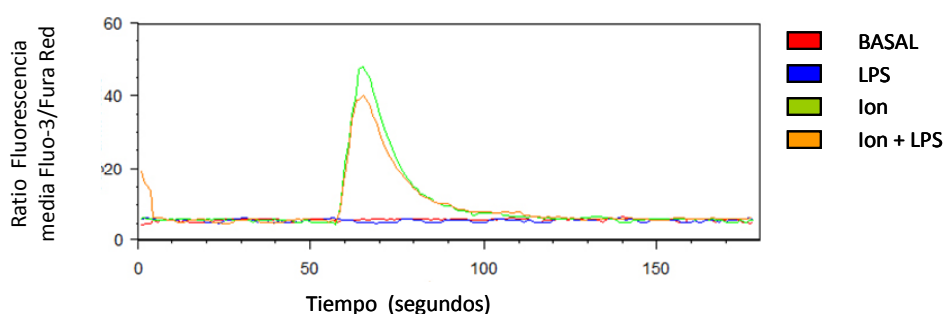
Tanto el efecto cooperativo entre el LPS y el Ion sobre la inducción de COX-2 como el efecto inhibitor del EGTA se observaron no sólo en la línea celular RAW 264.7 sino también en macrófagos peritoneales de ratón (**Figura 3B**).



**Figura 3. Efectos del EGTA sobre la inducción de la expresión de COX-2 en macrófagos.**

Las células RAW 264.7 y los macrófagos peritoneales de ratón fueron tratados durante 6 y 18h respectivamente, con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion + LPS, en presencia o ausencia de EGTA (2 mM). Los niveles de ARNm de COX-2 se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa en células RAW 264.7 (**A**) y en macrófagos peritoneales de ratón (**B**). Los resultados se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  respecto al basal. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  ### $p < 0,001$  respecto al tratamiento sin EGTA. **C.** Western Blot representativo del análisis de los niveles de COX-2 en células RAW 264.7, tras los diferentes tratamientos durante 6h. La gráfica de la derecha muestra los valores del análisis densitométrico en veces de inducción respecto al basal, tras la normalización de los niveles de proteína COX-2 con respecto a los de  $\beta$ -actina.

A su vez, comprobamos que, efectivamente, el tratamiento con el ionóforo de calcio promovía un aumento sustancial en la presencia de calcio intracelular en células RAW 264.7, empleando sondas fluorimétricas que permiten monitorizar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos nos mostraron que el tratamiento con Ion es capaz de generar un rápido aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sin que hubiera diferencias significativas en ausencia o en presencia de LPS (**Figura 4**). A su vez, constatamos que el tratamiento con LPS por sí mismo, no produce ningún cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los niveles basales en estas células.



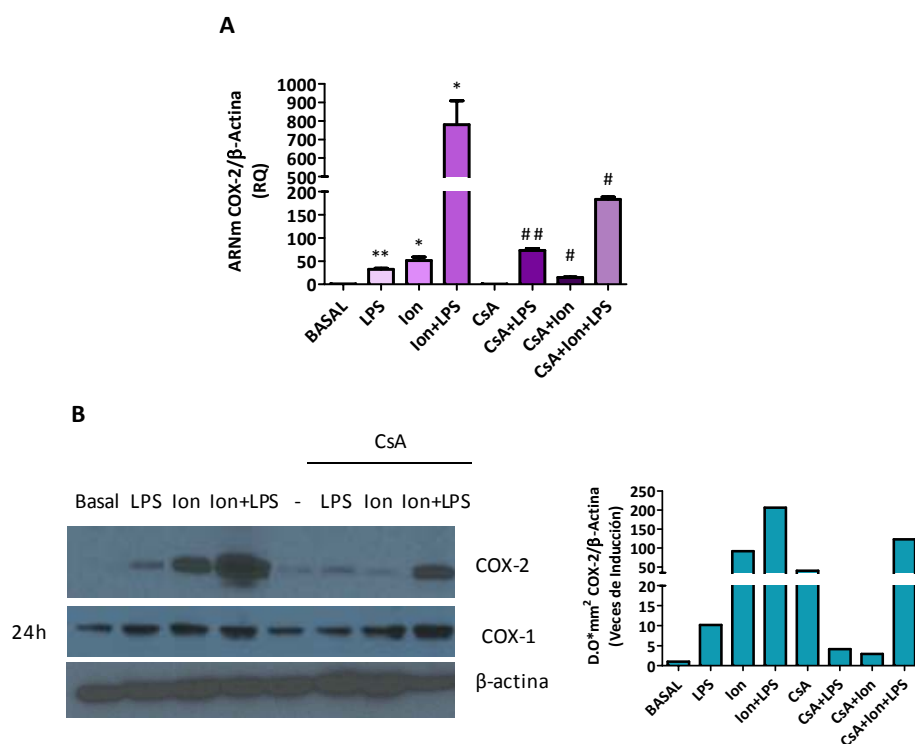
**Figura 4. Movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en células RAW 264.7.**

Las células se incubaron con las sondas fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-3/Fura Red. Mediante citometría de flujo se analizaron las variaciones de fluorescencia durante 120 segundos. Tras 60 segundos de monitorización en ausencia de estímulos se añadió LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion + LPS y se monitorizó durante 60 segundos más. Los resultados obtenidos se representan como la relación fluorescencia media Fluo-3/Fura Red respecto al tiempo.

### **1.2. La inducción de COX-2 en respuesta a ionóforo es sensible a CsA.**

El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es capaz de desencadenar una serie de señales que modulan la fisiología celular. El  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de unirse a la proteína CaM formando un complejo que modula la función de varias proteínas promoviendo su activación (Berridge *et al.*, 1998; Valeyev *et al.*, 2008). Entre otras, el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM participa en la activación de la proteína fosfatasa calcineurina determinante en la activación del factor de transcripción NFAT. La actividad de la Cn puede ser inhibida por drogas inmunosupresoras como la CsA o el FK506 (Kang *et al.*, 2007).

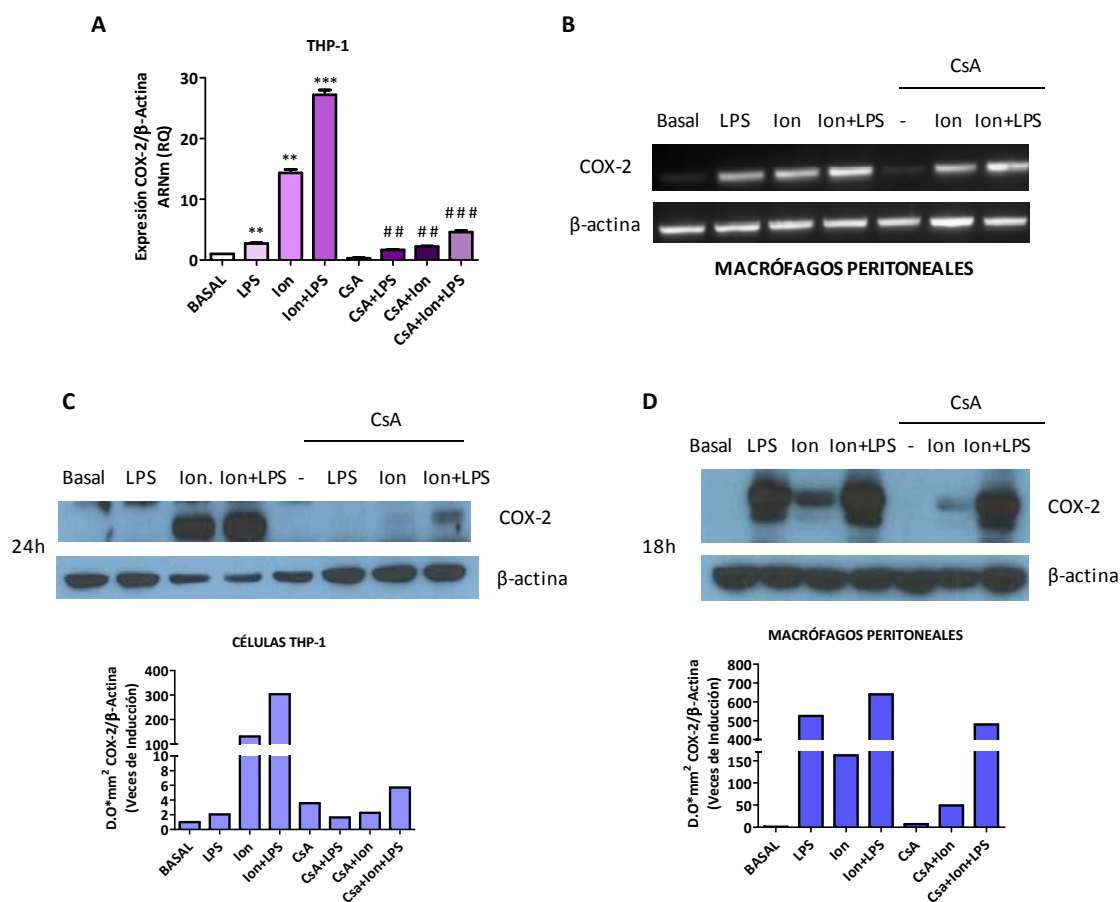
Con el fin de analizar la posible implicación de la Cn en las acciones del ionóforo de calcio en células RAW 264.7, analizamos el efecto de la CsA sobre la expresión de COX-2 a nivel de ARNm y de proteína. Como se muestra en las **figuras 5A y 5B**, la inducción de la expresión de COX-2 en respuesta a Ion o Ion+LPS se vio atenuada en presencia de CsA, mientras que la inducción promovida por LPS en ausencia de Ion solo no se alteró de forma significativa por el tratamiento con CsA. A diferencia de Cox-2 la expresión de la otra isoforma, COX-1, no se vio alterada con los diferentes tratamientos.



**Figura 5. Efecto de ciclosporina A sobre la inducción de COX-2 mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  en células RAW 264.7.**

Las células RAW 264.7 se trataron durante 18h (**A**) y 24h (**B**) con LPS (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion+LPS, en presencia o ausencia de ciclosporina A (CsA) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). **A.** Análisis de la expresión de COX-2 por *RT-PCR* cuantitativa. Los resultados se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -Actina. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto al basal. # $p < 0.05$  y ## $p < 0.01$  respecto a tratamiento sin CsA. **B.** Ensayos de *Western Blot* que muestran los niveles de expresión de COX-2 y COX-1, además de la  $\beta$ -actina como control. La gráfica muestra la cuantificación de las bandas de proteína COX-2 por densitometría, en veces de inducción respecto al basal, tras la normalización con respecto a los niveles de  $\beta$ -actina.

En experimentos similares realizados en células THP-1 y en macrófagos peritoneales de ratón se observaron resultados similares, de tal forma que el tratamiento con CsA redujo de forma sustancial la inducción de los niveles de ARNm o de proteína COX-2 por Ion (**Figura 6**).

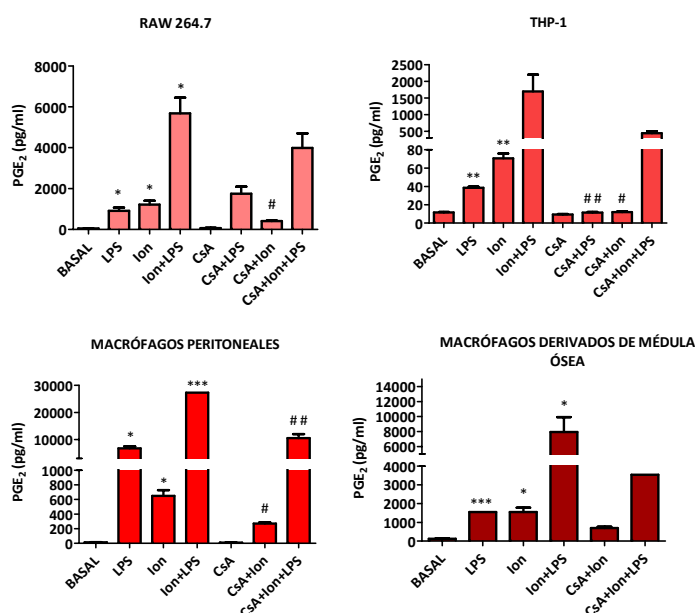


**Figura 6. Efecto de la ciclosporina A sobre la inducción de COX-2 por  $Ca^{2+}$  en células THP-1 y en macrófagos peritoneales de ratón.**

Las células THP-1 y los macrófagos peritoneales se trataron durante 24h y 18h respectivamente, con LPS (2  $\mu$ g/ml), Ion (0,5  $\mu$ M) y Ion + LPS en presencia o ausencia de ciclosporina A (CsA) (1  $\mu$ g/ml). **A y B.** Análisis de la expresión de COX-2 en células THP-1 (**A**) por RT-PCR cuantitativa o en macrófagos peritoneales (**B**) por RT-PCR convencional. Los resultados de la RT-PCR cuantitativa se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -Actina \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  respecto al basal. ### $p < 0.01$  respecto al tratamiento sin CsA. **C y D.** Western Blots mostrando los niveles de proteína COX-2 en células THP-1 (**C**) y macrófagos peritoneales de ratón (**D**). Los paneles inferiores muestran la densitometría de las bandas de COX-2 en veces de inducción respecto al basal, normalizados por los niveles de  $\beta$ -actina.

Con el fin de comprobar si el incremento en la expresión de COX-2 observado en presencia de Ion estaba ligado a un aumento en la producción de  $PGE_2$ , se realizaron ensayos ELISA con sobrenadantes de células RAW 264.7, THP-1, macrófagos peritoneales de ratón y macrófagos derivados de médula ósea. Como se muestra en la **Figura 7**, existe una correlación entre el efecto sobre la expresión de COX-2 y la

producción de PGE<sub>2</sub> tras el tratamiento con LPS, Ion o la combinación de ambos. Es más, en presencia de CsA, que como vimos anteriormente disminuye la inducción en la expresión de COX-2, se observa una menor producción de PGE<sub>2</sub>, evidente en los tratamientos que incluían ionóforo.



**Figura 7. Efecto del Ca<sup>2+</sup> y de la CsA sobre la producción de PGE<sub>2</sub> en macrófagos.**

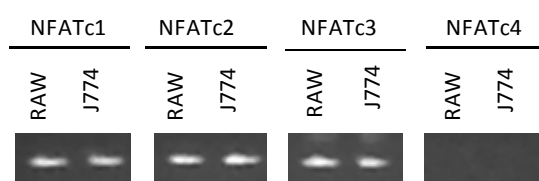
Las líneas celulares RAW 264.7 y THP-1, así como los macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea de ratón, se trataron durante 18h con LPS (2 µg/ml), Ionóforo A23187 (Ion) (0,5 µM) o Ion + LPS en presencia o ausencia de CsA (1 µg/ml). En los sobrenadantes de estos cultivos se determinó la concentración de PGE<sub>2</sub> mediante ELISA. Los resultados se muestran como la concentración media (pg/ml) ± SD. \*p<0,05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al basal. #p<0.05 y ##p<0.01 respecto al tratamiento sin CsA.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto un papel relevante de la señalización mediada por Ca<sup>2+</sup> en la inducción de COX-2 en macrófagos, siendo además capaz de cooperar con la señal promovida por el LPS. Por otro lado, el efecto inhibitor de la CsA sobre esta inducción, sugiere la participación de la fosfatasa Cn en el proceso.

### 1.3. Papel de NFAT en la regulación de COX-2 dependiente de calcio.

La activación de Cn promueve la desfosforilación del factor de transcripción NFAT, permitiendo su translocación al núcleo para inducir la transcripción de genes diana (Crabtree y Olson, 2002; Horsley y Pavlath, 2002). Dado que nuestros resultados sugerían la participación de Cn en la inducción transcripcional de COX-2 en respuesta al incremento de calcio, y que en la literatura han sido descritos sitios NFAT en el promotor de COX-2, esenciales para la regulación transcripcional de la misma en otros tipos celulares (Íñiguez *et al.*, 2000), decidimos comprobar la implicación de NFAT en la regulación de la expresión de COX-2 en macrófagos.

En primer lugar, analizamos la presencia y activación de NFAT en nuestros modelos celulares de macrófagos. NFAT está compuesto por una familia de factores de transcripción (NFATc1, c2, c3 y c4) regulados por la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , además de la variante NFAT5 que se regula por estrés osmótico (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 1997). Por *RT-PCR* convencional comprobamos que las líneas celulares RAW 264.7 y J774 presentan una expresión a nivel basal de NFATc1, NFATc2 y NFATc3, sin que detectáramos la presencia de ARNm para NFATc4 (**Figura 8**). La expresión de los diferentes NFATs se analizó también por *RT-PCR* cuantitativa en células RAW 264.7 por comparación de sus Cts con la Ct media para el ARNm de un gen de alta expresión como la  $\beta$ -actina, que fue de 22 ciclos. Los resultados obtenidos confirmarían la existencia de unos niveles apreciables de expresión de NFATc1, NFATc2 (Ct media de 28,5 ciclos) y de NFATc5 (Ct media de 28) y una muy baja expresión de NFATc4 (Ct media de 37,5).

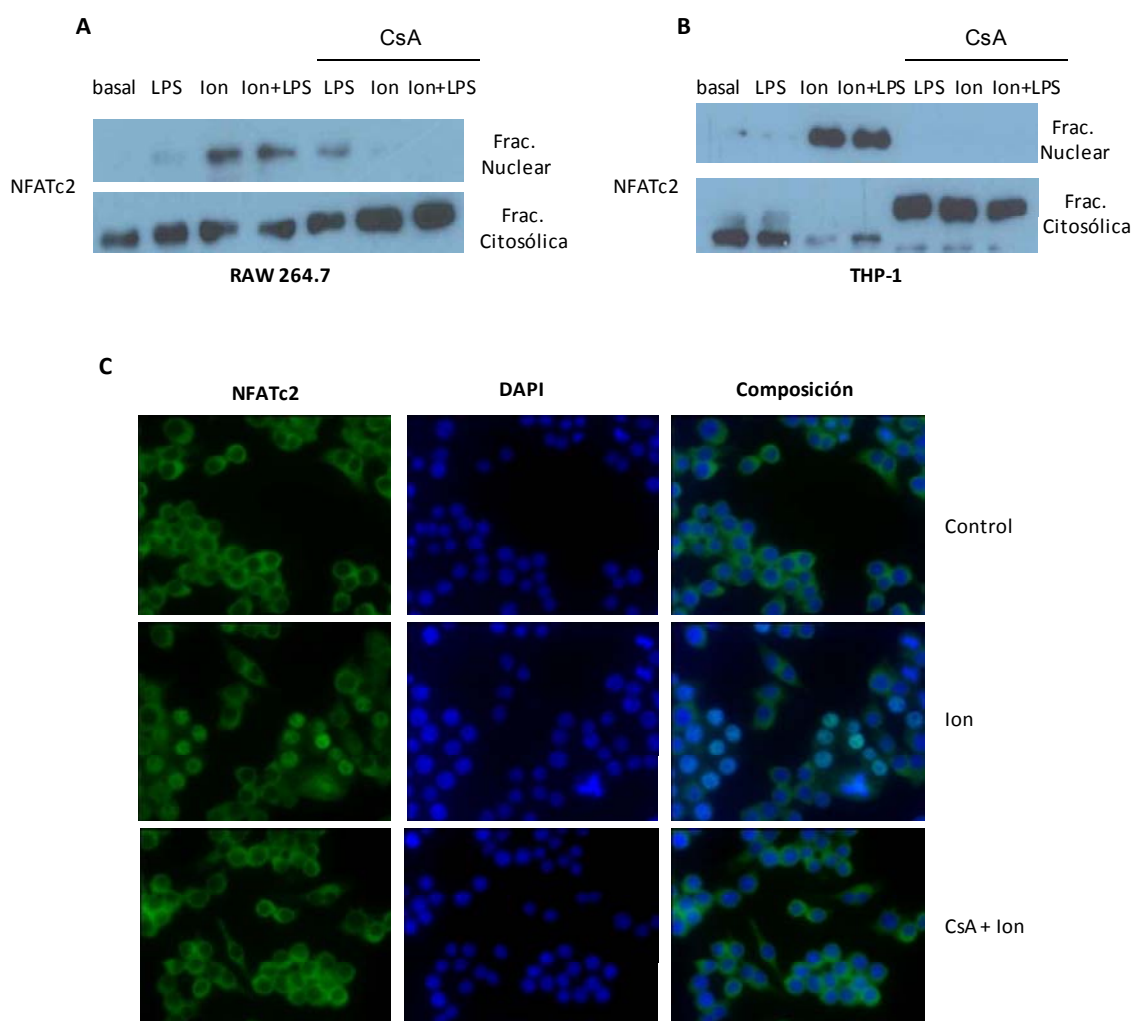


**Figura 8. Análisis de la expresión de NFAT en macrófagos.**

La expresión de NFATc1, NFATc2, NFATc3 y NFATc4 en las líneas celulares de ratón RAW 264.7 y J774 se analizó mediante *RT-PCR* convencional.

Una vez demostrada la presencia de miembros de la familia NFAT en las células RAW 264.7, decidimos analizar su activación y su capacidad para regular la transcripción génica en estas células en respuesta al tratamiento con Ion. La activación de NFAT, presente en el citosol en un estado altamente fosforilado, ocurre tras una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que promueve su desfosforilación tras la activación de Cn, lo que permite la entrada en el núcleo de NFAT. En primer lugar analizamos la expresión de NFATc2 en extractos citosólicos y nucleares de células RAW 264.7 empleando un anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como desfosforilada de NFATc2. En la **figura 9A** se muestra que el tratamiento con Ion, ya sea solo o en combinación con LPS, produce un aumento de la expresión de NFAT en la fracción nuclear, mientras que en presencia de CsA la expresión de NFAT se localiza en su totalidad en la fracción citosólica. En células no estimuladas o tratadas con LPS podemos ver que NFAT se expresa principalmente en la fracción citosólica, si bien en respuesta a LPS encontramos un ligero aumento en la inducción de la expresión de NFAT en la fracción nuclear. Encontramos resultados similares en células THP-1 (**Figura 9B**), donde el tratamiento

con Ion y Ion+LPS provocó no sólo un aumento de la expresión de NFATc2 en la fracción nuclear sino un descenso notable en la expresión de este factor de transcripción en la fracción citosólica. El tratamiento con CsA, por el contrario, produjo el aumento de la expresión de NFAT en la fracción citosólica. Finalmente, mediante inmunofluorescencia (**Figura 9C**), demostramos como, efectivamente, el tratamiento con Ion fue capaz de inducir la entrada en el núcleo de NFATc2 en las células RAW 264.7 mientras que en presencia de CsA se evitaba dicha translocación.

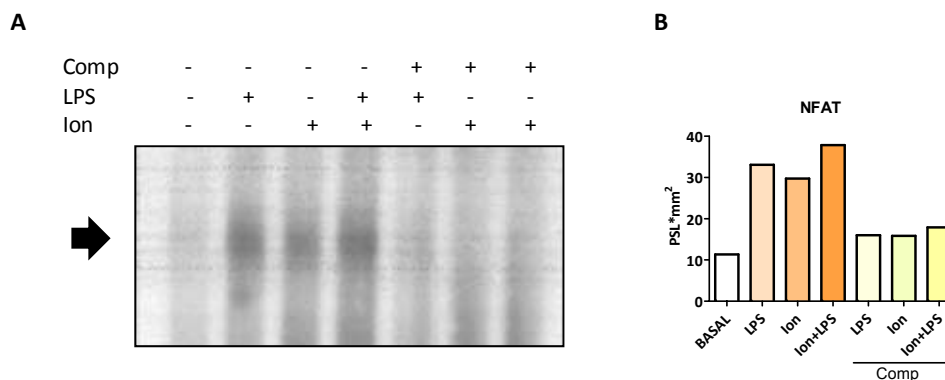


**Figura 9. Efecto del LPS, ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la CsA sobre la localización celular de NFAT.**

**A y B.** *Western blots* mostrando la expresión de NFATc2 en extractos nucleares (Frac. Nuclear) y citosólicos (Frac. Citosólica) de células RAW 264.7 (**A**) y células THP-1 (**B**) tratadas durante 1h 30min con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion + LPS. Donde se indica, se añadió CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 45 min antes que el resto de los estímulos. **C.** Las células RAW 264.7 se trataron durante 30 min con Ion (0,5  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia de CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). La presencia de NFATc2 se detectó mediante inmunofluorescencia tras la incubación de las células con un anticuerpo anti-NFATc2 y empleando un anticuerpo secundario unido a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Se muestran imágenes representativas tomadas en un microscopio de fluorescencia Axioskop 2 Plus.



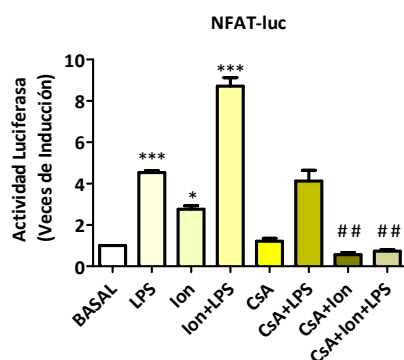
Una vez en el núcleo, NFAT se une a secuencias específicas en la región promotora de genes diana, modulando su transcripción. Mediante ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), confirmamos la unión de NFAT a secuencias específicas de ADN en respuesta a LPS, Ion y la combinación de ambos (**Figura 10**).



**Figura 10. Efecto del Ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  y del LPS sobre la unión de NFAT al ADN en células RAW264.7**

Las células RAW 264.7 se trataron con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (0,5  $\mu\text{M}$ ) y Ion + LPS (0,5  $\mu\text{M}$  + 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Se obtuvieron extractos nucleares que se analizaron por EMSA utilizando una sonda NFAT (IL-2) marcada radiativamente. La especificidad de unión se comprobó añadiendo un exceso del oligonucleótido sin marcar como competidor (Comp). **A.** La formación de complejos de retardo se determinó tras la autorradiografía de los geles de acrilamida en los que se resolvieron las muestras. **B.** Cuantificación de la señal radiactiva (*Photo Stimulated Luminiscence*/mm<sup>2</sup>) tras la exposición de los geles en un bioanalizador Fuji BAS-1500.

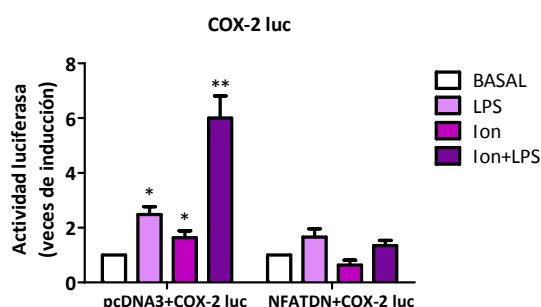
Basándonos en ello, analizamos seguidamente el efecto del Ion sobre la actividad transcripcional dependiente de NFAT mediante transfecciones transitorias de células RAW 264.7 con la construcción NFAT luc que contiene el promotor mínimo de IL-2 con tres copias de un sitio de unión de NFAT. La estimulación con LPS o Ion, y en mayor medida la combinación de ambos estímulos, aumentó significativamente la actividad transcripcional dependiente de NFAT. El tratamiento con CsA inhibió el aumento producido en respuesta a Ion, bien solo o en combinación con LPS (**Figura 11**).



**Figura 11. Análisis de la activación transcripcional mediada por NFAT en células RAW 264.7**

Las células RAW 264.7 se transfectaron con el plásmido NFAT-luc y se estimularon durante 6h con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion+LPS en presencia o ausencia de CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). La actividad luciferasa medida en los lisados celulares, está representada como Veces de inducción (RLUs muestra/RLUs basal)  $\pm$  SD, normalizada con respecto a los niveles de proteína. \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  respecto al basal. ## $p < 0.01$  respecto al tratamiento sin CsA.

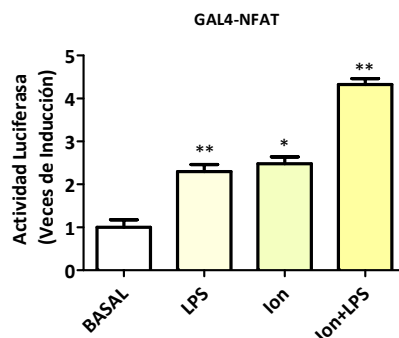
A continuación, estudiamos si la inducción de la expresión de COX-2 producida por Ion era dependiente de NFAT. Para ello empleamos un plásmido que codifica para una proteína que inhibe la localización nuclear de NFAT (NFATDN) junto con una construcción COX-2 luc, comprobamos que se producía un descenso notable de la inducción de la actividad transcripcional de COX-2 en respuesta a Ion y Ion+LPS cuando se co-transfectó con NFATDN. La inducción producida por el LPS también se vio ligeramente reducida cuando se empleó NFATDN (**Figura 12**).



**Figura 12. Estudio de la activación transcripcional de COX-2 y efecto del bloqueo de NFAT.**

Las células RAW 264.7 se co-transfectaron con el plásmido COX-2 luc junto con el vector de expresión control (pcDNA3) o un vector de expresión de un NFAT que actúa como dominante negativo (NFATDN). Tras la transfección, las células se trataron durante 6h con LPS (2 µg/ml), ionóforo A23187 (Ion) (0,5 µM) o Ion+LPS, en presencia o ausencia de CsA (1 µg/ml). Los resultados de actividad luciferasa se normalizaron respecto a los niveles de proteína en el extracto y se representan como veces de inducción (RLUs muestra/RLUs basal) ± SD. \*p<0.05 y \*\*\*p<0.001 respecto al basal. ##p<0.01 respecto al tratamiento sin CsA. NFATDN = NFAT dominante doble negativo.

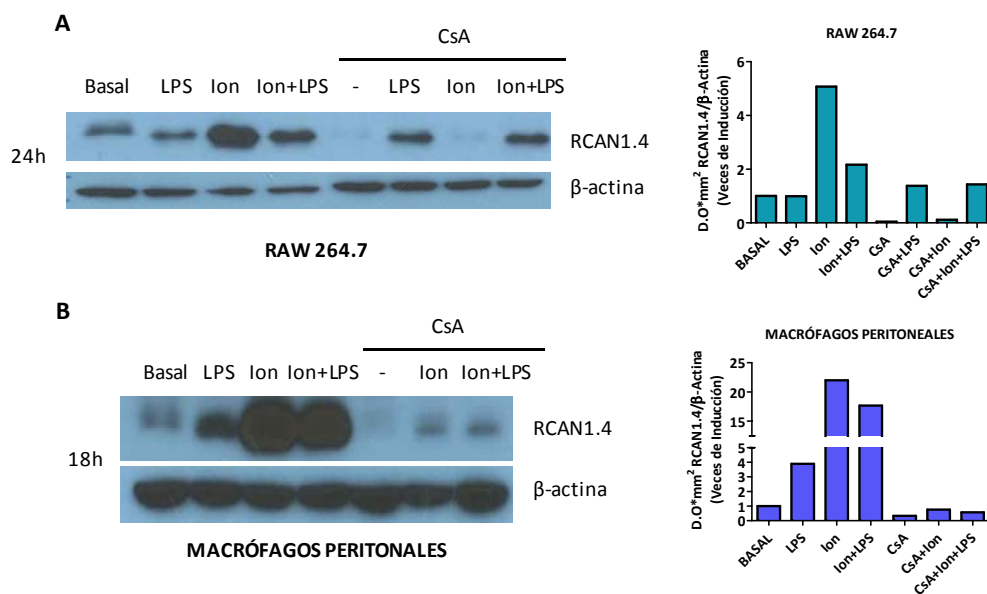
Tras la activación de NFAT y su consiguiente unión al DNA, este factor es capaz de promover un incremento en la transcripción génica a través de diversos mecanismos en los que ejerce un papel esencial el dominio transactivador (TAD), que en el caso de NFATc2 se encuentra localizado principalmente en la región N-terminal (Ortega-Perez et al., 2005; Rao et al., 1997). Se realizaron ensayos de co-transfección con el plásmido GAL4-NFAT (1-415) que expresa una proteína quimérica conteniendo los primeros 15 aa del dominio transactivador amino terminal de NFATc2 fusionado al dominio de unión al ADN de la proteína GAL4 (GAL4-DBD), junto con un plásmido reportero dirigido por sitios de unión para GAL4 (GAL4-luc). Como se puede apreciar en la **figura 13**, el tratamiento con LPS o Ion es capaz de inducir la actividad transactivadora de NFAT, produciéndose un efecto cooperativo en presencia de ambos estímulos, de forma similar a lo observado con el plásmido NFAT-luc.



**Figura 13. Efecto del Ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  y del LPS sobre la capacidad de transactivación de NFAT en células RAW 264.7**

Las células fueron co-transfectadas con los plásmidos pGAL4-h-NFATc2 (1-415) (GAL4-NFAT) y pGAL4 5x luc y se estimularon durante 6h con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Ion (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion+LPS. La actividad luciferasa, normalizada con respecto a los niveles de proteína, se representa como Veces de inducción (RLUs muestra/RLUs basal)  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto al basal.

En conjunto, nuestros resultados indicaban la participación de la vía de señalización  $\text{Ca}^{2+}$ /Cn/NFAT en la inducción transcripcional observada en macrófagos en respuesta al tratamiento con Ion. Para confirmarlo, estudiamos el efecto del LPS y del Ion sobre la expresión de RCAN1, una proteína regulada por Cn/NFAT en diversos tejidos. La estimulación de las células RAW 264.7 con Ion produjo un incremento sustancial de los niveles de proteína RCAN1.4 mientras que en presencia de LPS no se apreciaron cambios significativos con respecto al basal. En el tratamiento combinado con Ion+LPS, si bien parece observarse cierta inducción, fue en cualquier caso menor que la observada con el Ion sólo. En presencia de CsA se anuló la inducción promovida por el Ion (**Figura 14A**). Por otra parte, en macrófagos peritoneales de ratón, tanto el LPS como el Ion, en mayor medida, produjeron un incremento en los niveles de proteína RCAN1.4, sin que se observara cooperación al usar el estímulo combinado. En este caso, la inducción de Ion o de Ion+LPS fue inhibida en presencia de CsA. (**Figura 14B**).



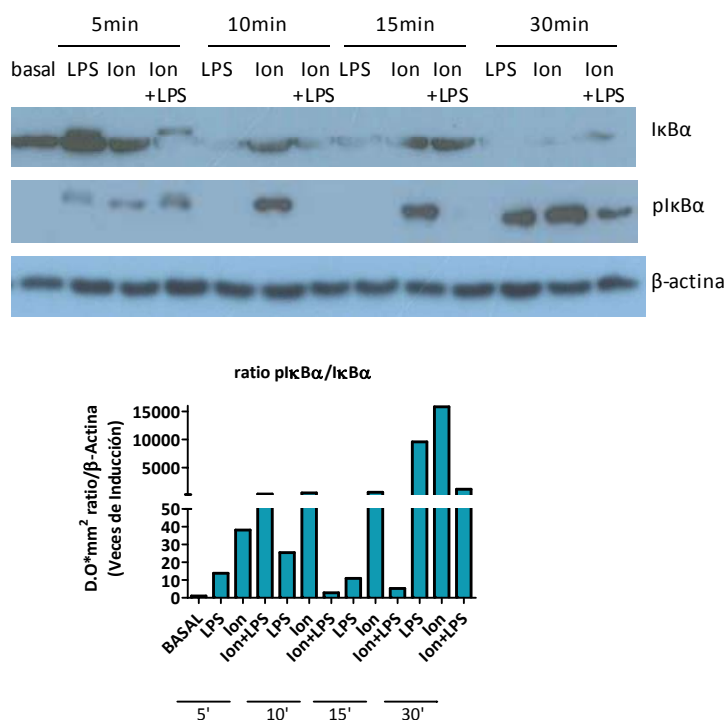
**Figura 14. Efecto del Ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  y del LPS en la expresión de RCAN1.4 en células RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales de ratón.**

Las células RAW 264.7 (**A**) y los macrófagos peritoneales (**B**) se estimularon durante 24 y 18h respectivamente, con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion + LPS, en presencia o ausencia de CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Los niveles de proteína RCAN1.4 y de  $\beta$ -actina como control, se analizaron mediante *Western Blot*. Las gráficas muestran la densitometría de las bandas de RCAN1.4 en veces de inducción respecto al basal, normalizados por los niveles de  $\beta$ -actina.

#### 1.4. Papel de NF- $\kappa\text{B}$ en la regulación de COX-2 dependiente de calcio.

NF- $\kappa\text{B}$  es un importante factor de transcripción que regula genes que controlan multitud de procesos como la apoptosis, la adhesión celular, la proliferación, mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa y la inflamación, entre otros (Perkins, 2007). I $\kappa$ B es una proteína inhibidora que se encuentra unida a NF- $\kappa\text{B}$  manteniéndolo en el citoplasma. Ante diferentes estímulos, se produce la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B, permitiendo la translocación al núcleo de NF- $\kappa\text{B}$  (Doyle y O'Neill, 2006). La implicación de NF- $\kappa\text{B}$  en la activación del macrófago por LPS se encuentra ampliamente descrita en la literatura y es clave en la expresión de genes pro-inflamatorios como TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$  y en el control transcripcional de COX-2 (Perkins, 2007; Vila-del Sol y Fresno, 2005; Zhang y Wei, 2011). Además, varios artículos relacionan también la activación de NF- $\kappa\text{B}$  con la Cn (Kim *et al.*, 2004; Zhang y Wei, 2011), por lo que decidimos ver si también estaba implicado en la regulación de COX-2 dependiente de calcio.

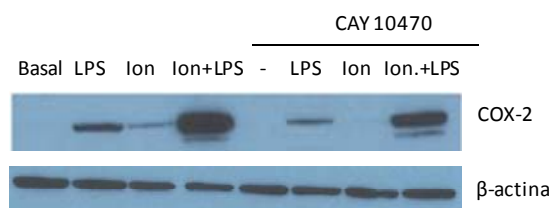
Para ello, analizamos por *Western Blot* la expresión de IκB fosforilada y no fosforilada en respuesta a LPS, Ion y la combinación de ambos. El resultado obtenido nos muestra cómo la fosforilación y degradación de IκB en las muestras estimuladas con LPS y su combinación con Ion, es más rápida que con el ionóforo solo. Además, la estimulación con Ion no parece provocar una degradación de IκB pero sí una fosforilación, a diferencia de lo que ocurre en presencia de LPS (**Figura 15**).



**Figura 15. Análisis de la fosforilación de IκB en respuesta a LPS y a Ionóforo de Ca<sup>++</sup> en células RAW 264.7**

Las células RAW 264.7 fueron tratadas con LPS (2 µg/ml), Ionóforo A23187 (0,5 µM) o Ion + LPS a diferentes tiempos (5 a 30 min). Los niveles de proteína IκBα o de IκBα fosforilada (pIκBα) se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos. La gráfica muestra los valores densitométricos obtenidos para la relación entre las bandas de IκBα vs pIκBα, normalizados por los niveles de β-actina y expresados en veces de inducción respecto al basal.

Realizamos también experimentos empleando el inhibidor de NF-κB, CAY10470, donde observamos que era capaz de disminuir la activación provocada por el Ion y su combinación con LPS (**Figura 16**). Esto nos lleva a pensar, que tal vez en la inducción de COX-2 por calcio no sólo sea importante NFAT sino que también participen otras vías como la señalizada por NF-κB.



**Figura 16. Efecto de la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B sobre la expresión de COX-2 en células RAW 264.7.**

Las células se trataron con LPS (2  $\mu$ g/ml), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu$ M) o Ion + LPS (0,5  $\mu$ M + 2  $\mu$ g/ml) en presencia o ausencia del inhibidor de NF- $\kappa$ B CAY10470 (1  $\mu$ M), durante 18h. Los niveles de proteína COX-2 se analizaron mediante *Western Blot*. Como control se muestran los niveles de  $\beta$ -actina.

## 5. Regulación de la expresión de COX-2 en respuesta a ligandos de GPCRs acoplados a proteína $G\alpha_q$ .

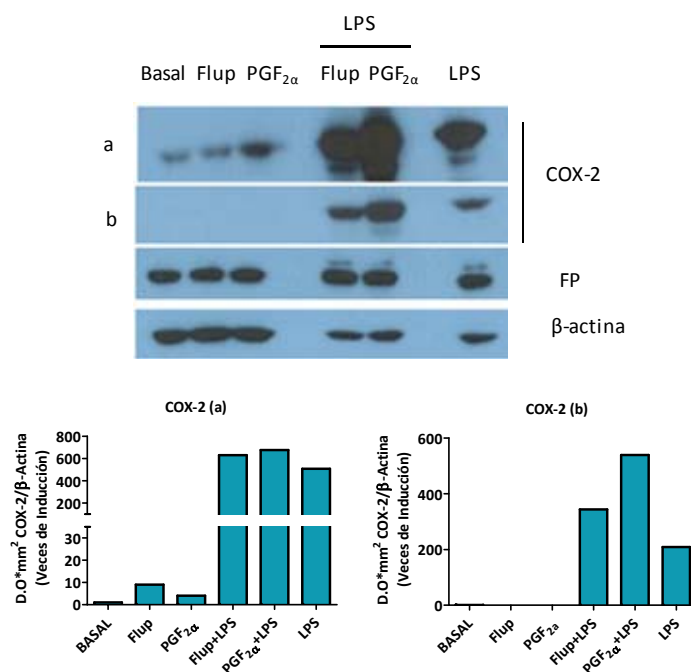
Una vez determinado el papel de la señalización por el  $Ca^{2+}$  en la inducción transcripcional de COX-2 dependiente de NFAT con el uso del ionóforo de A23187, decidimos analizar los efectos de estímulos capaces de inducir un aumento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular, como son los agonistas de GPCRs acoplados a la proteínas  $G\alpha_q$ . La unión de los ligandos a estos receptores activa la fosfolipasa C, dando lugar a la liberación de inositol-3-fosfato (IP3) y diacilglicerol, los cuales actuarán sobre diferentes cascadas de señales. En particular, el IP3 es capaz de mediar la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares, promoviendo la señalización de vías dependientes del mismo (Abramovitz *et al.*, 1994; Narumiya y FitzGerald, 2001).

### 5.1. Efectos de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en la expresión de COX-2 en macrófagos.

La  $PGF_{2\alpha}$  es una prostaglandina que participa en diferentes procesos fisiológicos como en la función reproductora femenina (Basu, 2010), el mantenimiento de la función renal (Gilbert *et al.*, 2011) y de la presión intraocular (Kunapuli *et al.*, 1997), además de estar involucrada en enfermedades cardiovasculares (Basu, 2007). Su unión al receptor FP, induce la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular, siendo capaz de activar al factor de transcripción NFAT en procesos como el crecimiento de músculo esquelético (Horsley y Pavlath, 2003; Iñiguez *et al.*, 2008).

Analizamos los efectos de la  $PGF_{2\alpha}$  y del fluprostenol (Flup) como agonistas del receptor FP sobre la inducción de COX-2 en macrófagos. En primer lugar, comprobamos que las células RAW 264.7 expresaban el receptor FP, cuyos niveles no

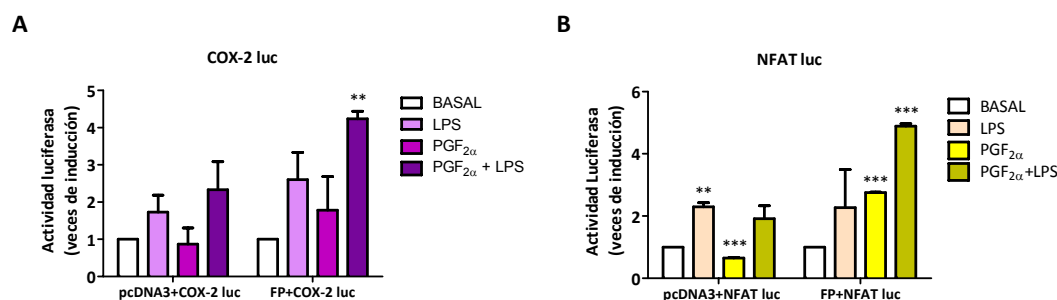
se alteraban con ninguno de los tratamientos (**Figura 17**). Observamos que ambos agonistas del receptor FP fueron capaces de inducir la proteína COX-2, siendo este efecto inductor más evidente en cooperación con el LPS.



**Figura 17. Análisis de la inducción de la expresión de COX-2 en respuesta a PGF<sub>2α</sub>.**

Las células RAW 264.7 se trataron durante 24h con LPS (2 µg/ml), PGF<sub>2α</sub> (1 µM), fluprostenol (Flup) (1 µM) o combinaciones de éstos dos últimos con LPS. La expresión de COX-2, del receptor FP y de la β-actina se analizó mediante *Western Blot*. Las gráficas del panel inferior muestran la densitometría de las bandas de COX-2 en veces de inducción respecto al basal, normalizados por los niveles de β-actina. (a y b representan dos exposiciones del revelado del *Western Blot* con el anticuerpo anti-COX-2).

Por último, realizamos transfecciones transitorias en células RAW 264.7, en las que se cotransfectó el receptor FP junto con los plásmidos COX-2 luc o NFAT luc. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la PGF<sub>2α</sub> es capaz de inducir la actividad transcripcional mediada por el promotor de COX-2 en presencia del receptor FP, cooperando con el LPS. Resultados similares se observaron en el análisis de la actividad transcripcional dependiente de NFAT mediante el uso del plásmido NFAT luc (**Figura 18**).



**Figura 18. Regulación por PGF<sub>2α</sub> de la actividad del promotor de COX-2 y de la actividad transcripcional mediada por NFAT en células RAW 264.7.**

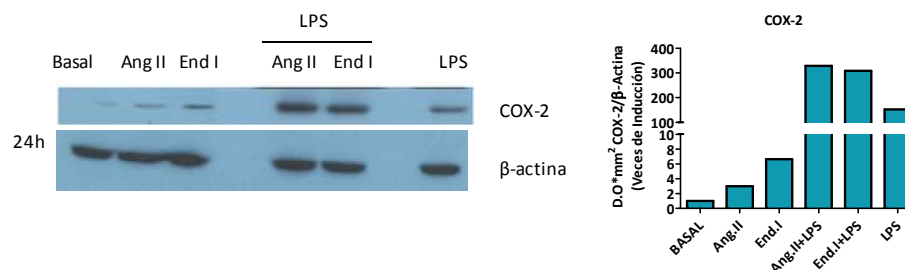
Las células RAW 264.7 se co-transfectaron con la construcciones COX-2 luc (**A**) o NFAT luc (**B**), junto con un plásmido de expresión de FP o el plásmido control pcDNA3. Tras la transfección, las células se trataron con LPS (2 µg/ml), PGF<sub>2α</sub> (1 µM) y la combinación de ambos durante 6 horas. La actividad luciferasa medida en los lisados celulares se representa como veces de inducción (RLUs muestra/RLUs basal) ± SD, normalizada con respecto a los niveles de proteína. \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 respecto al basal.

## 5.2. Papel de angiotensina II y endotelina I en la expresión de COX-2 en macrófagos

La angiotensina II (Ang II) y la endotelina I (End I) son dos moléculas capaces de inducir un aumento de los niveles de calcio intracelular a través de su unión a sus respectivos receptores, pertenecientes a la familia de GPCRs (Deacon y Knox, 2010; Mehta y Griendling, 2007). Existen evidencias que relacionan a la Ang II en la inducción de COX-2 en diferentes tipos celulares y en procesos cancerígenos (Morinelli *et al.*, 2009; Slice *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que esta activación puede desarrollarse a través de la vía Cn/NFAT en células de endometrio de rata (Abraham *et al.*, 2012). Por otro lado, y al igual que la Ang II, la End I también es capaz de aumentar la expresión de COX-2 en varios tipos celulares (Deacon y Knox, 2010; Pratt *et al.*, 2003).

Con el fin de conocer si estos agentes eran capaces de inducir la expresión de COX-2 en macrófagos, analizamos la expresión de ésta en células RAW 264.7 tratadas con Ang II o End I, en presencia o ausencia de LPS. Tanto la Ang II como la End I produjeron una inducción de la COX-2, aunque menor que LPS, siendo capaces de cooperar con este para producir una notable inducción de esta enzima tanto en el ARNm como en la proteína (**Figura 19**).





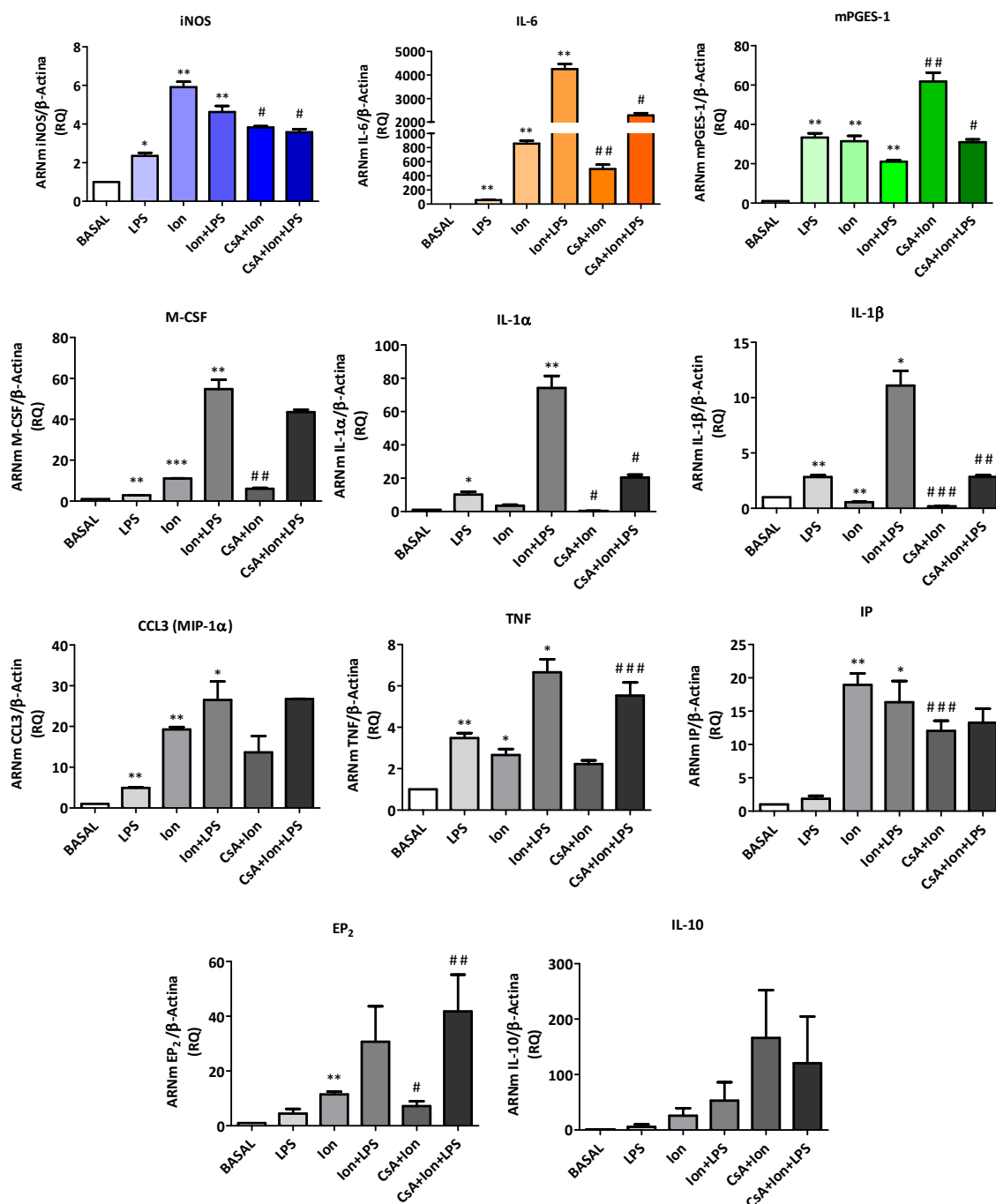
**Figura 19. Regulación de la expresión de COX-2 por angiotensina II y endotelina I en células RAW 264.7.**

Las células RAW 264.7 se trataron durante 24h con LPS (2 µg/ml), angiotensina (Ang) II (100 nM), endotelina (End) I (100 nM) solas o combinadas con LPS. La expresión de COX-2 se determinó mediante *Western blot*. La gráfica muestra la densitometría de las bandas de COX-2 en veces de inducción respecto al basal, normalizada por los niveles de β-actina.

## 6. El $\text{Ca}^{2+}$ regula la expresión de múltiples genes en macrófagos.

Seguidamente analizamos el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre intracelular en la expresión de génica en macrófagos. Para ello, se analizaron por *RT-PCR* cuantitativa 96 genes relacionados con el proceso inflamatorio (ver material suplementario). La **figura 20** muestra el efecto del tratamiento con LPS o Ion, bien solos o combinados, así como el efecto de la CsA, sobre los niveles de ARNm de genes seleccionados, entre los que se encuentran citoquinas (IL-6, IL-1α, IL-1β, TNFα o IL-10), quimioquinas y factores de crecimiento (CCL3, M-CSF) y genes relacionados con la producción de mediadores inflamatorios como el NO (iNOS) o PGs (mPGES-1) o con la señalización de éstas como receptores de prostanoideos (IP, EP2). Según la variación de su expresión en respuesta a los diferentes estímulos, observamos diferentes perfiles. Por un lado, se observa que, en mayor o menor medida, la expresión de todos ellos, excepto el IP, se induce de forma significativa en respuesta a LPS. Para algunos de ellos se puede observar un efecto inductor del Ion, mayor de 10 veces de inducción en el caso de la IL-6, la mPGES-1, CCL3, M-CSF, IP, EP2 e IL-10 y menor de 10 veces, aunque significativo, en el caso de la iNOS o el TNF, mientras que la expresión de IL-1α o IL-1β no se vio alterada. En cuanto al tratamiento combinado de Ion+LPS, se puede observar un claro efecto cooperativo, e incluso sinérgico en algún caso, para la expresión de todos ellos excepto en el caso de la iNOS o la mPGES-1. En lo que respecta a la CsA, los resultados obtenidos indican que ésta tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la inducción mediada por el Ion, ya fuera solo o en combinación con LPS, en el caso de iNOS, IL-6, M-CSF, IL-1α, IL-1β o IP, mientras que no afectó la expresión de otros como la mPGES-1, CCL3, TNFα o EP2 o incluso tuvo un claro efecto inductor como en el caso de la IL-10. Con el fin de validar los resultados del *array* y analizar en mayor detalle

los efectos observados, se amplió el estudio de la expresión de algunos de los genes incluidos en el mismo, como la mPGES-1, la iNOS o la IL-6.



**Figura 20. Análisis del efecto del tratamiento con Ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , LPS y CsA sobre la expresión génica en células RAW 264.7**

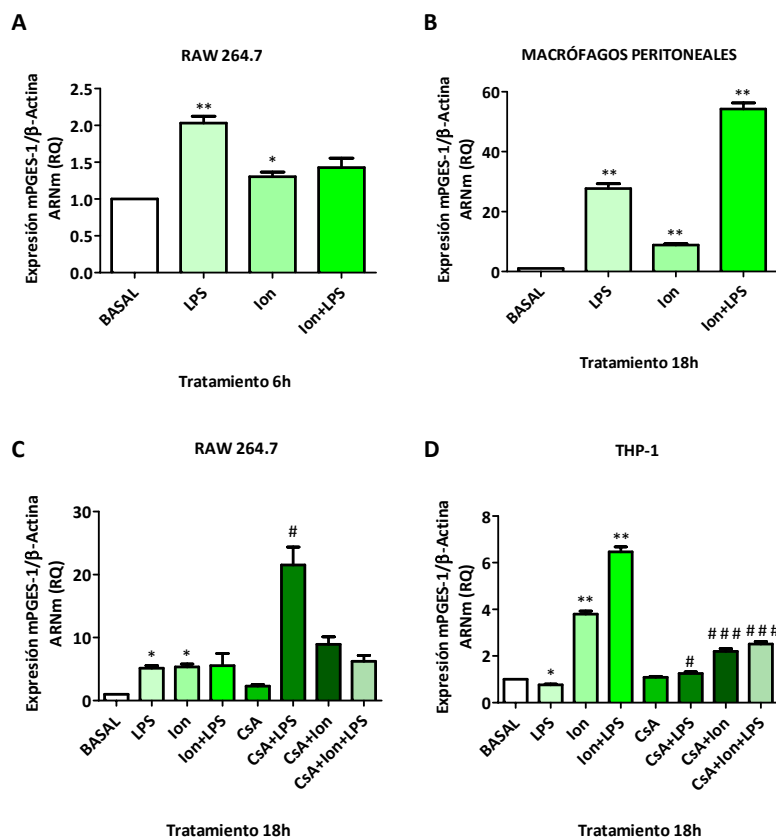
Las células RAW 264.7 se trataron durante 18h con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ), Ion+LPS, en presencia o ausencia de ciclosporina A (CsA) (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Las gráficas muestran los datos obtenidos en el análisis de la expresión de los genes indicados en la figura, procedentes de los resultados del análisis por RT-PCR cuantitativa de un array en el que se analizó la expresión de 96 genes (ver figura suplementaria 1). Los datos obtenidos se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  respecto al basal. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  respecto al tratamiento sin CsA.

### 6.1. Regulación de mPGES-1 por $\text{Ca}^{2+}$ .

La mPGES-1 participa de la producción exacerbada de  $\text{PGE}_2$  en procesos inflamatorios, o en respuesta a estímulos tales como el LPS o IL-1 $\beta$ . Para ello, se asocia a la COX-2, induciéndose de forma coordinada, aunque más tardía, con ésta (Díaz-Muñoz *et al.*, 2010; Samuelsson *et al.*, 2007).

El estudio de las variaciones en la expresión de mPGES-1 en respuesta a LPS, Ion o Ion+LPS se llevó a cabo por *RT-PCR* cuantitativa en células RAW 264.7, macrófagos peritoneales de ratón y células THP-1 a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos muestran que, en células RAW 264.7, la inducción de la expresión de mPGES-1 por LPS ocurre esencialmente a tiempos tardíos, con una inducción del orden de 6 veces a las 18 horas, si bien se produce ya una inducción significativa de mPGES-1 a las 6 horas. El Ion promovió la inducción de la expresión de mPGES-1 tras 18 horas de tratamiento sin que se observara una cooperación por el tratamiento combinado de Ion+LPS (**Figuras 21A y C**). Por su parte, en macrófagos peritoneales de ratón, se produce un incremento significativo de la expresión de mPGES-1 tanto con LPS como con Ion tras 18 horas de tratamiento, con un efecto cooperativo en presencia de ambos estímulos (**Figura 21B**). El efecto inductor del Ion en la expresión de mPGES-1 y su cooperación con LPS también se observó en células THP-1 (**Figura 21D**).

En cuanto al efecto de la CsA, podemos ver que en las células RAW 264.7, la esta produjo un incremento en la expresión de mPGES-1 en comparación con los tratamientos donde no estaba (**Figura 21C**). En cambio, en células THP-1, la presencia de CsA disminuyó el incremento en la expresión de mPGES-1 producido por Ion sólo o en combinación con el LPS (**Figura 21D**).



**Figura 21. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y la CsA sobre la inducción de mPGES-1 en macrófagos**

Las células RAW 264.7, THP-1 y macrófagos peritoneales de ratón se trataron durante 6 o 18 h con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion + LPS. Donde se indica, se añadió CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Análisis de la expresión de mPGES-1 por RT-PCR cuantitativa en células RAW 264.7 (**A y C**), en macrófagos peritoneales (**B**) y en células THP-1 (**D**). Los datos se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto al basal. # $p < 0.05$  y ### $p < 0.001$  respecto a tratamiento sin CsA.

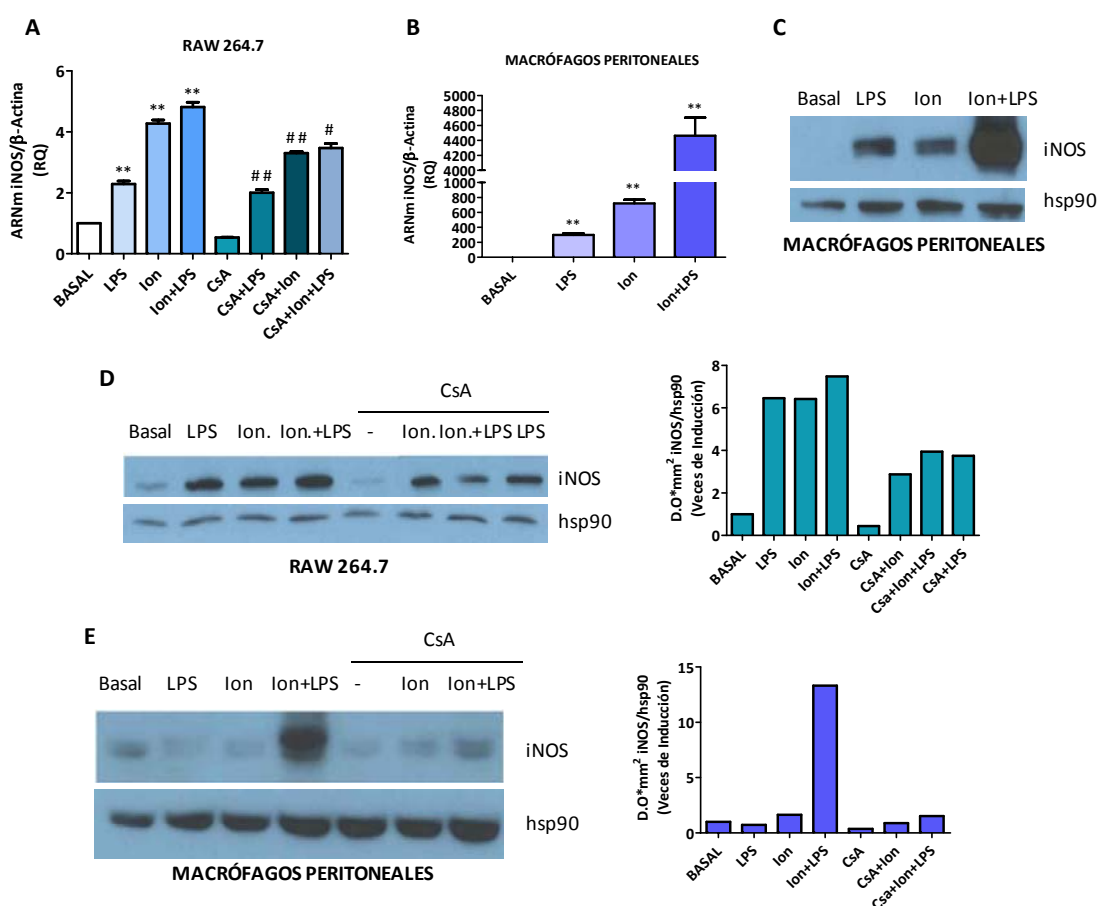
## 6.2. Regulación de iNOS por $\text{Ca}^{2+}$ .

La enzima iNOS se encarga de sintetizar óxido nítrico en respuesta a estímulos inflamatorios, como citoquinas y LPS (Kim *et al.*, 2004).

Los experimentos realizados en RAW 264.7, nos muestran que, tanto a nivel de ARNm como de proteína, el Ion provoca un aumento de la expresión de iNOS, similar al producido por LPS, aunque no parece que la combinación de Ion+LPS provoque un aumento mayor (**Figura 22A y 22D**). En macrófagos peritoneales de ratón, se obtuvieron resultados comparables, en tanto en cuanto el Ion produjo una inducción de la expresión de iNOS similar a la producida por el LPS, aunque en este tipo celular la

combinación de Ion con LPS provocó un aumento considerable en la expresión de iNOS tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figuras 22B y 22C**).

Tanto en células RAW 264.7 como en macrófagos peritoneales de ratón el tratamiento con CsA inhibió notablemente la inducción de la expresión de iNOS en respuesta al Ion, ya fuera solo o en combinación con LPS (**Figuras 22A, 22D y 22E**).

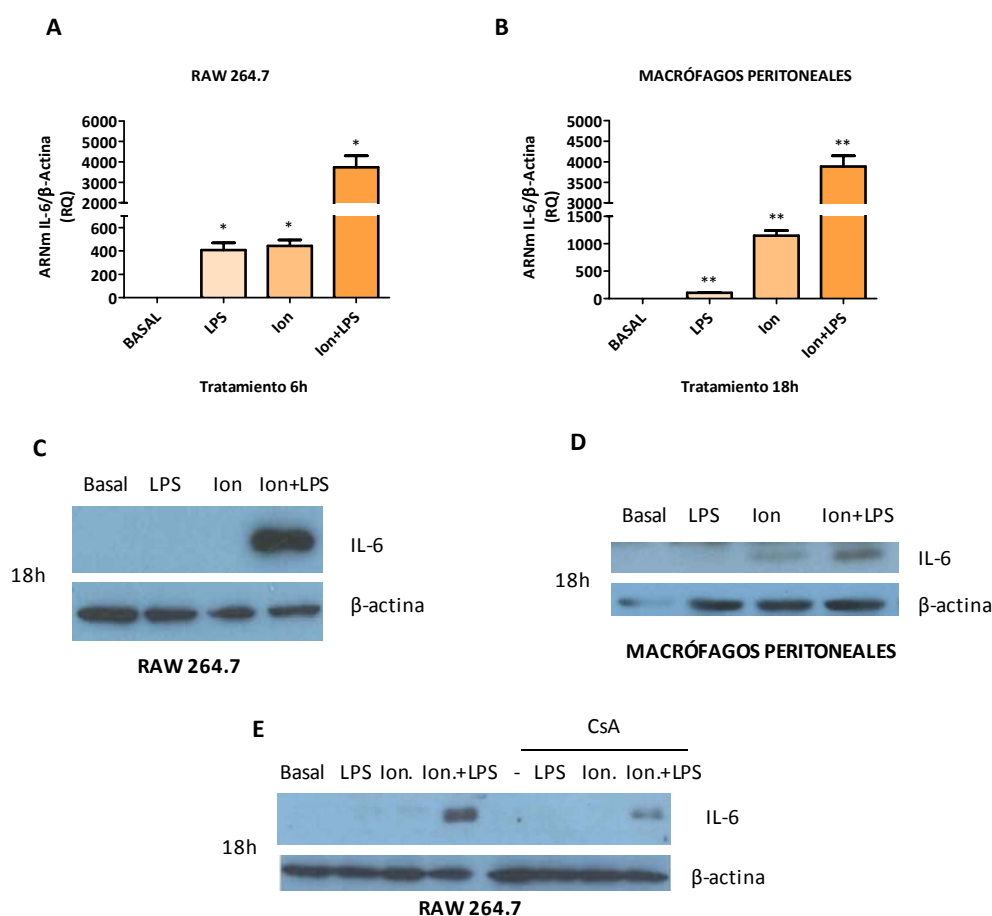


**Figura 22. Efecto de la CsA sobre la inducción de iNOS en respuesta a LPS y  $\text{Ca}^{2+}$  en RAW 264.7 y macrófagos peritoneales de ratón.**

Las células se trataron durante 18h con LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ), ionóforo (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion+LPS. Cuando se indica, las células se trataron con CsA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). **A y B.** Análisis de la expresión de COX-2 mediante RT-PCR cuantitativa en células RAW 264.7 (**A**) y macrófagos peritoneales de ratón (**B**). Los resultados se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. \*\* $p < 0.01$  respecto al basal. # $p < 0.05$  ## $p < 0.01$  respecto al tratamiento sin CsA. **C, D y E.** Análisis de la expresión de iNOS mediante Western blot en RAW 264.7 (**D**) y macrófagos peritoneales (**C y E**). Como control se muestran los niveles de la proteína hsp90. La gráfica muestra la densitometría de las bandas de COX-2 en veces de inducción respecto al basal, normalizada por los niveles de hsp90.

### 6.3. Regulación de IL-6 por $\text{Ca}^{2+}$ .

Uno de los genes cuya expresión se inducía muy notablemente en el *array* tras el tratamiento con Ion era la IL-6. Tanto en células RAW 264.7 como en macrófagos peritoneales de ratón se produjo un incremento significativo de IL-6 en presencia de Ion, con un efecto sinérgico en presencia de LPS tanto a nivel de ARNm como de proteína (Figura 23). Esta inducción fue sensible al tratamiento con CsA (Figura 23E).



**Figura 23. Efecto de la CsA sobre la inducción de la expresión de IL-6 en respuesta a LPS y  $\text{Ca}^{2+}$  en macrófagos.**

Las células RAW 264.7 y los macrófagos peritoneales de ratón se estimularon con LPS (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ionóforo A23187 (Ion) (0,5  $\mu\text{M}$ ) o Ion + LPS. A y B. Análisis mediante *RT-PCR* cuantitativa de los niveles de ARNm de COX-2 en células RAW 264.7 tras 6h de tratamiento (A) y en macrófagos peritoneales tras 18h de tratamiento (B). Los resultados se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. \* $p < 0.05$  \*\*,  $p < 0.01$  respecto al basal. C, D y E. Análisis mediante *Western blot* de los niveles de proteína COX-2 en células RAW 264.7 (C) y en macrófagos peritoneales (D y E) tras 18h de tratamiento. Como control se muestran los niveles de  $\beta$ -actina.

## II. PAPEL DE COX-2 EN ATEROSCLEROSIS. EFECTO DE LA AUSENCIA DE COX-2 EN EL TRANSPORTE DEL COLESTEROL EN MACRÓFAGOS.

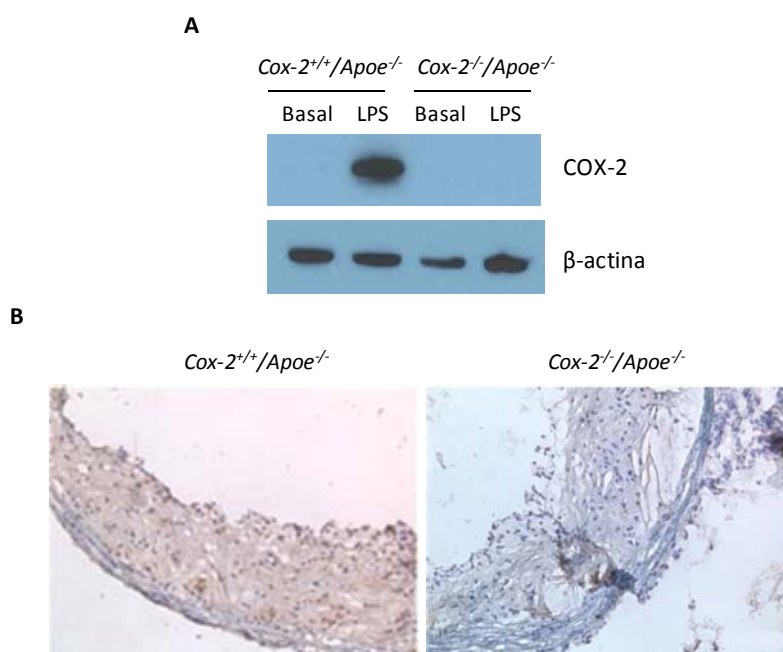
La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y progresiva de la pared arterial, caracterizada por la acumulación de lípidos en las paredes de los vasos sanguíneos y la formación de lesiones ateromatosas que, en fases avanzadas, pueden ocluir la luz de los vasos (Libby, 2002). En este proceso están implicados varios tipos celulares como células del sistema inmune (linfocitos T y macrófagos principalmente), células endoteliales y células musculares de la vasculatura. Entre los diversos mediadores que participan en la aterosclerosis se encuentran los prostanoideos, en cuya síntesis juega un papel relevante la COX-2. A pesar de que parece evidente que esta enzima debe jugar un papel en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, no se han logrado definir con precisión sus acciones en esta enfermedad. Así, diferentes estudios realizados en animales deficientes en COX-2 o tratados con AINEs selectivos inhibidores de su actividad, han descrito acciones tanto pro-aterogénicas como anti-aterogénicas (Funk y FitzGerald, 2007; Linton y Fazio, 2008; Mitchell y Warner, 2006).

Con el fin de aportar nuevas evidencias sobre el papel de COX-2 en la aterosclerosis, en esta tesis doctoral hemos generado un modelo de ratón deficiente en COX-2 en un fondo *Apoe*<sup>-/-</sup> (*Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>) en el que estudiar algunos de los parámetros clave en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica.

### 6. Generación y caracterización de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>.

Los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> se generaron a partir del cruce de ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup> con ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> tal y como se describe en el apartado de *Materiales y métodos*. Además del genotipado de los animales para la selección de aquéllos con genotipo *Cox-2*<sup>+/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>, se procedió a comprobar la expresión de COX-2 en macrófagos y en tejidos de estos animales. La **figura 24A** muestra la presencia de la proteína COX-2 en macrófagos de ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> tras el tratamiento con LPS y su ausencia en los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>. Así mismo, el revelado con un anticuerpo anti-COX-2 no produjo señal en cortes histológicos de aortas con placa de ateroma en los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>, mientras que sí se detectó la COX-2 presente en las aortas de los ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> (**Figura 24B**). Estos resultados, junto con otros datos no mostrados acerca de la expresión de COX-2 a nivel de ARNm, confirmaron la validez

del modelo de ratón generado para el análisis del efecto de la ausencia de COX-2 en nuestros estudios.



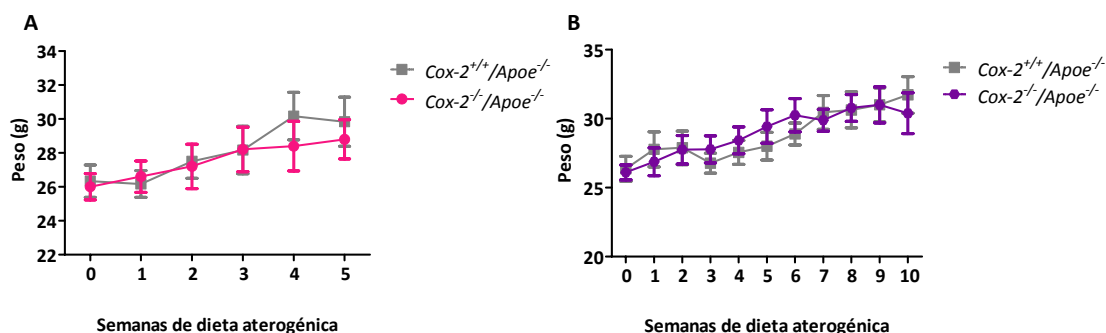
**Figura 24. Estudio de la expresión de COX-2 en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*.**

**A.** Análisis mediante *Western blot* de la expresión de COX-2 en macrófagos derivados de médula ósea de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* tratados durante 18h con LPS (2 µg/ml). Como control se muestran los niveles de β actina. **B.** Inmunohistoquímica de COX-2 en cortes de válvulas aórticas con placa de ateroma de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*.

## 7. Estudio de las lesiones de ateroma en ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*.

Los ratones *Apoe<sup>-/-</sup>* presentan unos niveles de colesterol en sangre incrementados debido a la ausencia de dicha lipoproteína, lo que les hace susceptibles de desarrollar aterosclerosis. La administración de una dieta rica en grasa y colesterol acelera el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y la formación de la placa en estos animales (Nakashima *et al.*, 1994). Así, en nuestros estudios usamos hembras *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* de 16 semanas de edad que se mantuvieron con dieta aterogénica durante 5 o 10 semanas. La **figura 25** muestra la evolución semanal del peso del grupo de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* en comparación con los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*. No se apreciaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre ambos grupos de ratones, ya hubieran estado alimentados con la dieta aterosclerótica durante 5 o durante 10 semanas.





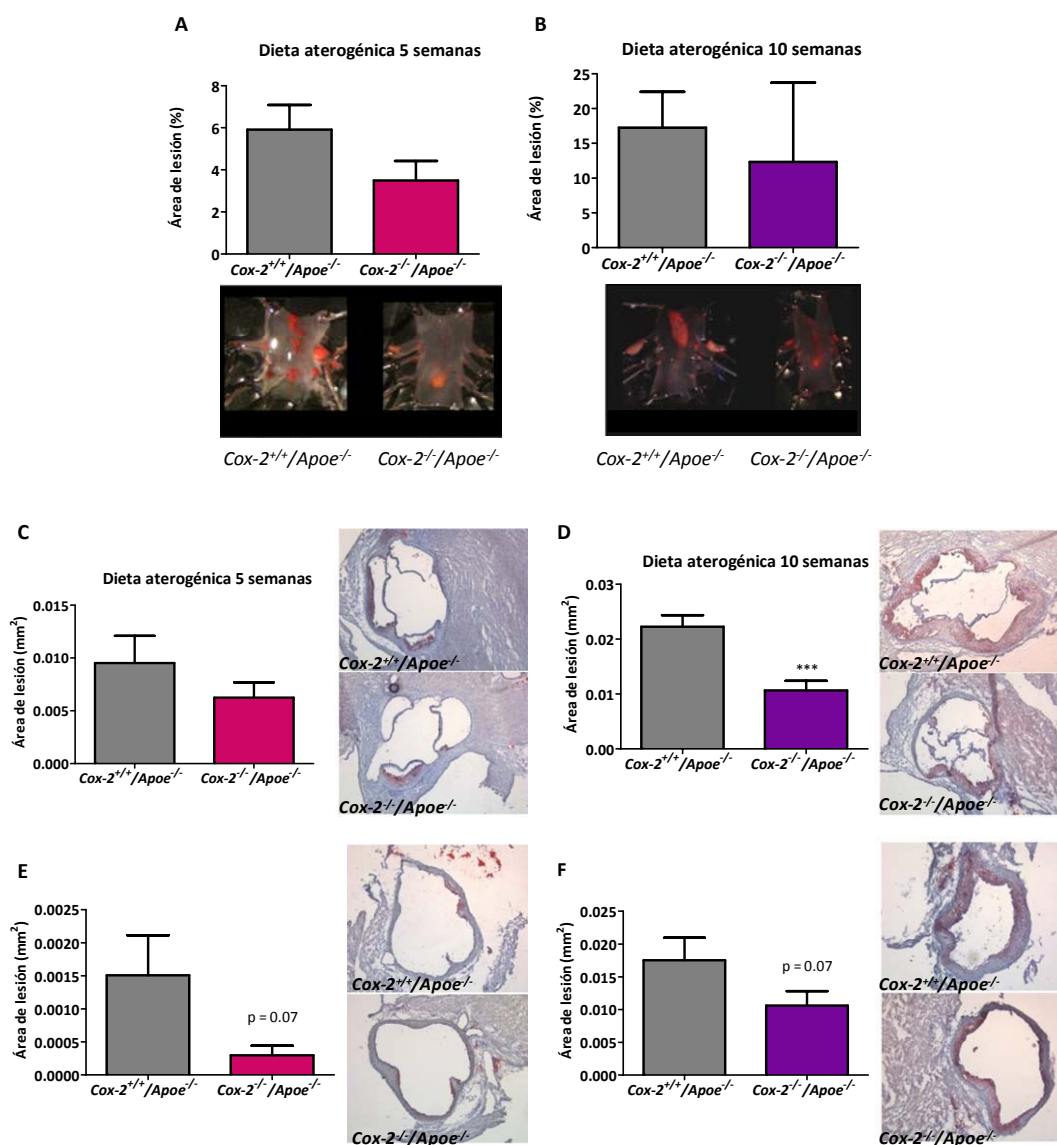
**Figura 25. Evolución del peso de los ratones durante el periodo de dieta.**

Los ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* fueron alimentados con una dieta grasa durante 5 semanas (n=6) (**A**) o 10 semanas (n=10) (**B**). Los ratones se pesaron semanalmente desde el momento de comenzar la dieta aterogénica (0). Los resultados se expresan como la media del peso de cada grupo  $\pm$  SD.

Con el fin de analizar cambios en la incidencia y desarrollo de la lesión aterosclerótica, se extrajeron y analizaron las aortas de ambos grupos de ratones tras la administración de la dieta hipercolesterolémica mediante tinciones de lípidos con Oil Red O (ORO), inmunohistoquímica y análisis de la expresión génica por *RT-PCR* cuantitativa.

La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de lípidos en la aorta, por lo que la tinción con ORO permite localizar el área de la lesión. El análisis de preparaciones *en face* de las lesiones tras tinción con ORO en aortas abiertas de manera longitudinal, mostró que el área ocupado por las lesiones era menor en el cayado aórtico de las aortas de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* en comparación con las aortas de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, tanto a las 5 como a las 10 semanas de dieta aterogénica (**Figuras 26A y 26B**).

La presencia de la lesión se determinó también mediante la tinción con ORO de cortes histológicos de 7  $\mu$ m de grosor de las aortas, localizados entre la región de las válvulas aórticas y el inicio de la aorta ascendente. A nivel de las válvulas aórticas, los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* presentaron un menor área de lesión tanto tras 5 semanas (**Figura 26C**) como tras 10 semanas (**Figura 26D**) de dieta aterogénica. Resultados similares se observaron en el estudio de los cortes histológicos en la aorta ascendente (**Figura 26E y 26F**).

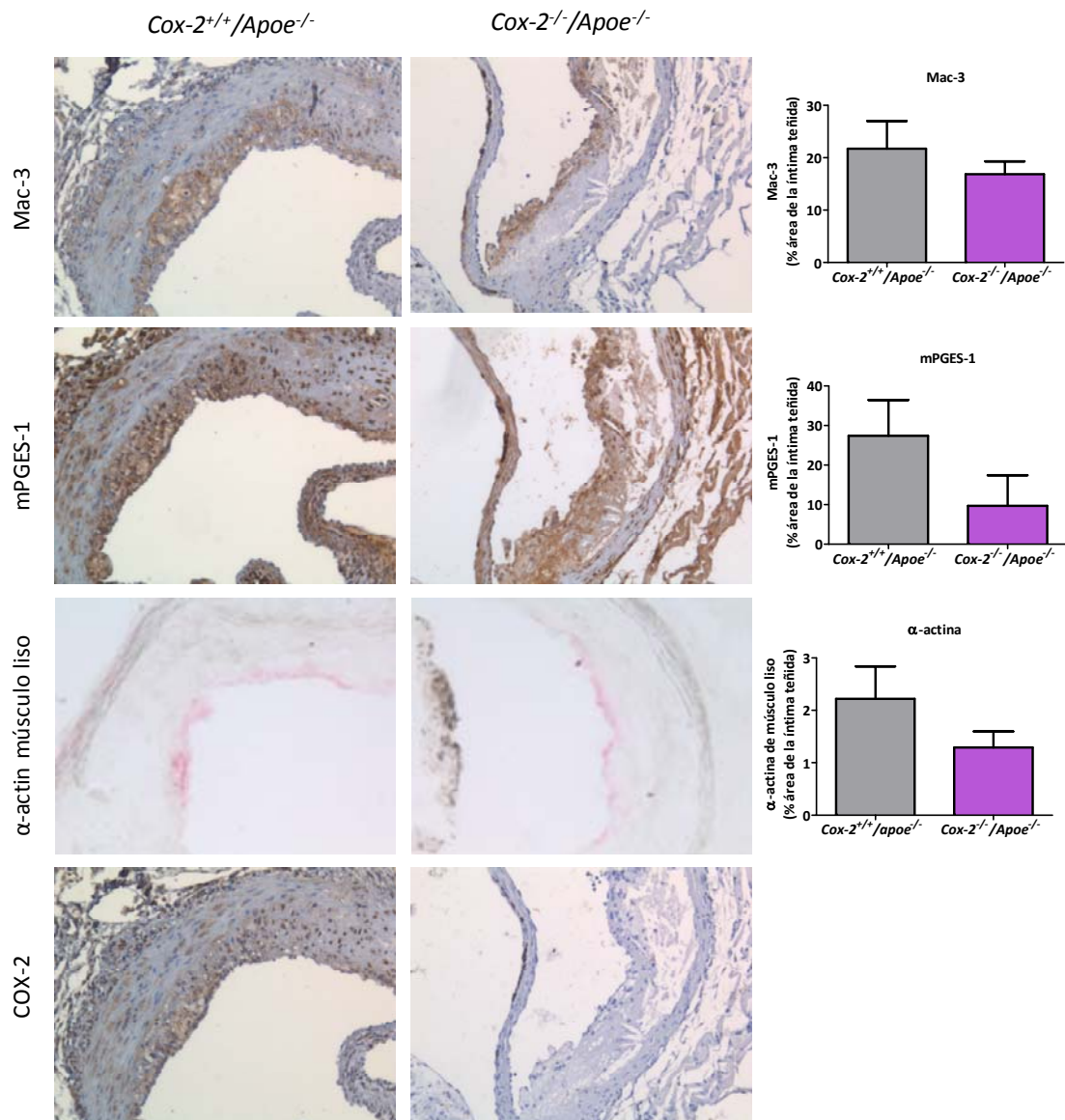


**Figura 26. Cuantificación de la lesión ateromatosa en la aorta.**

**A y B.** Análisis *en face* de la lesión mediante tinción con ORO de la región del cayado de aortas procedentes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* alimentados con dieta aterogénica durante 5 semanas (n=5) (**A**) o 10 semanas (n=4) (**B**). Las gráficas muestran los valores de la media de los datos obtenidos para cada grupo de animales para el porcentaje del área de la lesión teñida con ORO, con respecto al total  $\pm$  SD. **A-F.** Tinción con ORO de cortes histológicos seriados de aortas de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* sometidos a una dieta aterogénica durante 5 semanas (**C y E**) o 10 semanas (**D y F**). Las gráficas muestran la media de los valores del área de la lesión teñida en cada grupo de animales  $\pm$  SD. En **C** (n=6) y **D** (n=11) se muestran los datos obtenidos para la región de las válvulas aórticas y en **E** (n=6) y **F** (n=11) aquéllos obtenidos en el análisis de la aorta ascendente. \*\*\*p < 0.001 respecto a *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*. Las figuras muestran fotos representativas de la región aórtica en cada grupo de ratones.

En los cortes histológicos se realizaron inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-Mac-3 como marcador de macrófagos, anti-alfa actina de músculo liso vascular, anti-mPGES-1 y anti-COX-2. En todos los casos se detectó marcaje para dichas proteínas en las placas de ateroma de los animales sometidos a dieta grasa en los

ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$ . La superficie del área de la lesión con marcaje para Mac-3 y para  $\alpha$ -actina fue menor en los animales  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$ . Las lesiones en las aortas de ratones  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$  también mostraron una menor expresión de mPGES-1 y, como era de esperar, no presentaron expresión de COX-2 (Figura 27).

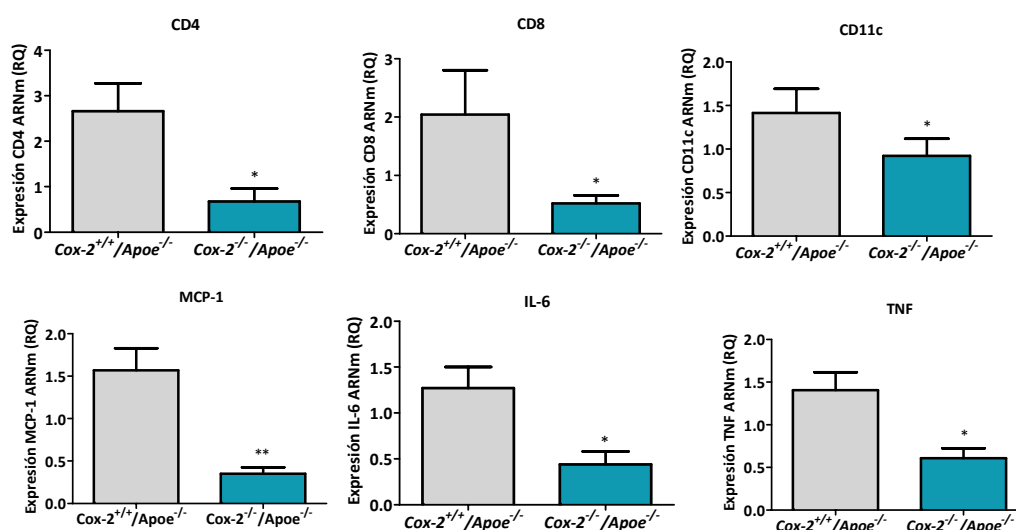


**Figura 27. Caracterización de las lesiones de ateroma mediante inmunohistoquímica.**

Análisis mediante tinciones inmunohistoquímicas de la expresión de Mac-3,  $\alpha$ -actina, mPGES-1 y COX-2 en cortes seriados de aorta, al nivel de las válvulas aórticas, de ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$  y  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$  alimentados con dieta aterogénica durante 10 semanas ( $n=5$ ). El área con tinción positiva para cada uno de los marcadores se midió en tres cortes histológicos y de cada uno se evaluaron al menos 3 secciones. Los resultados se expresan como la media de los valores para el porcentaje del área de la íntima teñida  $\pm$  SD. Las figuras muestran fotos representativas de la región aórtica en cada grupo de ratones.

## 8. Estudio de parámetros inflamatorios en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

El establecimiento de un proceso inflamatorio tiene un papel esencial en la formación de la placa de ateroma. Por esta razón, procedimos al estudio de la expresión de un grupo de genes relacionados con la respuesta inmune y la inflamación en las aortas de los dos grupos de ratones tras el tratamiento con la dieta aterogénica. Mediante *RT-PCR* se analizó la expresión de CD4 y CD8 como marcadores de poblaciones de linfocitos, de CD11c como marcador de macrófagos inflamatorios y células dendríticas. La expresión de todos ellos estaba disminuida de forma significativa en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* en comparación con los animales *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, apoyando la idea de la existencia de una menor presencia de leucocitos en las placas de ateroma de las aortas de los animales carentes de COX-2. Por su parte, la expresión de quimioquinas como MCP-1 y citoquinas como IL6 y TNF $\alpha$  también mostraron menores niveles de expresión en las aortas de los ratones *COX-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* (**Figura 28**).

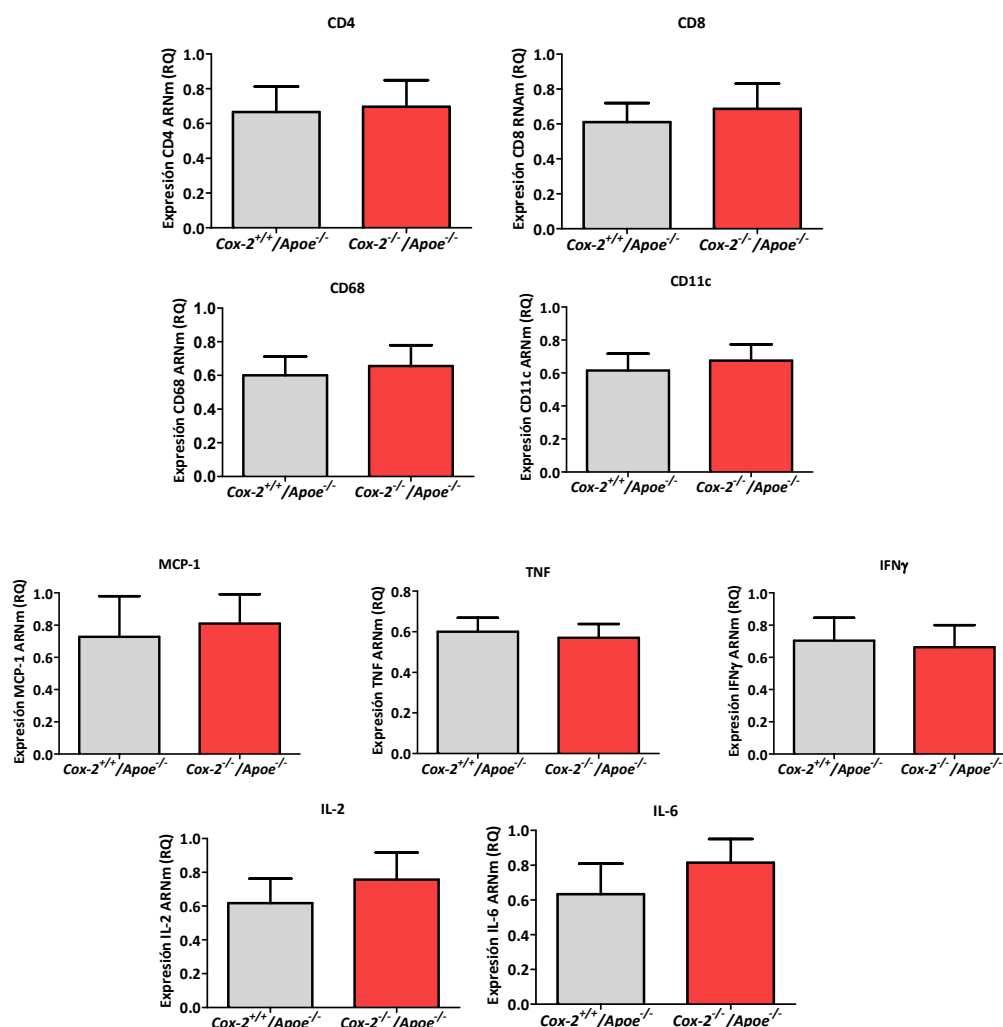


**Figura 28. Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y la inflamación en aortas de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>***

La expresión de CD4, CD8, CD11c, MCP-1, IL-6 y TNF $\alpha$  se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en extractos procedentes de aortas de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* sometidos a 10 semanas de dieta aterosclerótica. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los niveles de ARNr 18S y se expresaron como media de la RQ  $\pm$  SD. n=7 por grupo. \*p<0.05 respecto a los ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

La disminución en la expresión de los genes analizados indicaba una menor actividad inflamatoria en las aortas de los animales carentes de COX-2, por lo que procedimos a estudiar su expresión en el bazo, así como la presencia de diversas quimioquinas y citoquinas en suero, con la idea de analizar si estas observaciones se correspondían a nivel sistémico.

El bazo es un órgano central en la actividad del sistema inmune, por lo que procedimos a analizar en este órgano, mediante *RT-PCR* cuantitativa, la expresión de CD4 y CD8 como genes linfocitarios y de CD68 y CD11c como genes expresados por macrófagos o células dendríticas. A diferencia de lo observado en las muestras de aorta, no encontramos diferencias significativas en la expresión de estos genes entre los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*apoE*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>+/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> a las 10 semanas de tratamiento con la dieta grasa. Por otro lado, tampoco encontramos diferencias relevantes en la expresión en el bazo de estos dos grupos de animales de las citoquinas y quimioquinas analizadas (MCP-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-6) (**Figura 29**).

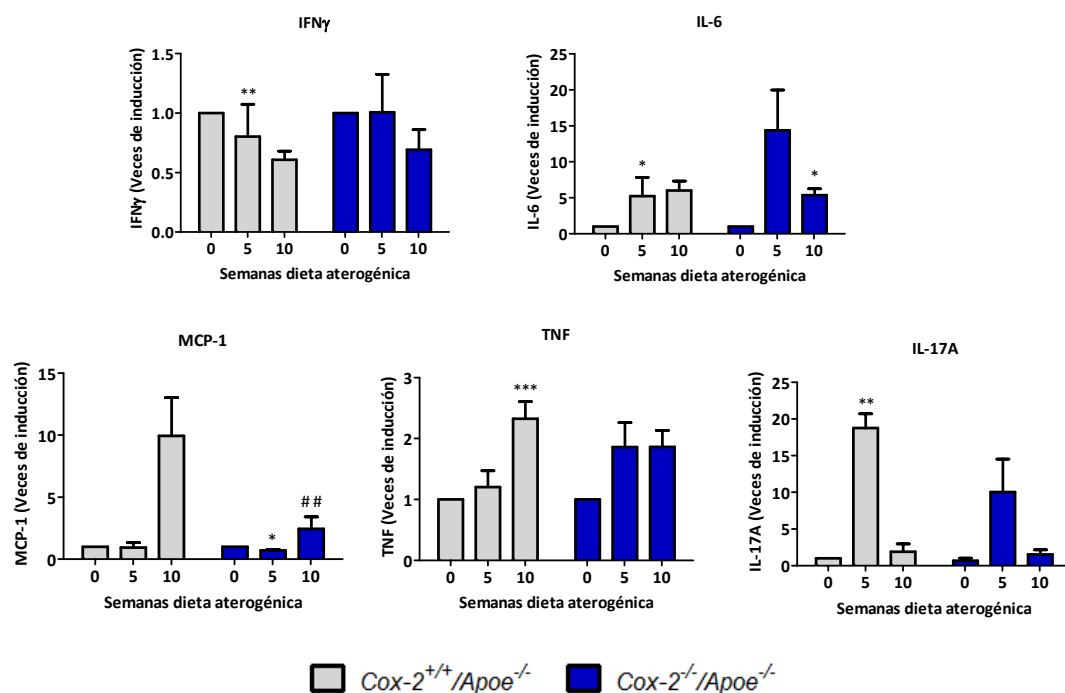


**Figura 29.** Análisis de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y la inflamación en bazos de ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>

La expresión de CD4, CD8, CD68, CD11c, MCP-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  IL-2 e IL-6 se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en extractos procedentes de bazos de ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> alimentados durante 10 semanas con dieta aterosclerótica. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los niveles de ARNr 18S y se expresaron como media de la RQ  $\pm$  SD. n=11 por grupo.

A su vez, se analizaron los niveles séricos de diferentes citoquinas,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-6 e IL-17A, y de la quimioquina MCP-1, con el fin de estudiar las posibles alteraciones en su producción como consecuencia de la dieta, en ambos grupos de ratones, comparando los valores presentes en el suero antes y después de 5 o 10 semanas de dieta aterogénica. Atendiendo a las variaciones en los niveles séricos de estas moléculas como consecuencia de la administración de la dieta grasa, se observó que, en el caso de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 IL-17A y MCP-1 se producía un aumento de sus niveles en suero tras la administración de la dieta tanto en los ratones  $\text{Cox-2}^{-/-}/\text{ApoE}^{-/-}$  y  $\text{Cox-2}^{+/+}/\text{ApoE}^{-/-}$ . Los perfiles de inducción de dichas citoquinas fueron diferentes, de tal forma que, mientras que los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  aumentaron de forma progresiva tras 5 y 10 semanas de dieta, en el caso de MCP-1, sólo se observó el aumento a las 10 semanas. Por su parte, el aumento en los niveles de IL-17A e IL-6 alcanzó su máximo en los sueros de los animales alimentados con dieta grasa durante 5 semanas. Por el contrario, los niveles de  $\text{IFN}\gamma$  disminuyeron en los sueros de los animales tratados con dieta durante 10 semanas.

En cuanto a la comparación entre las variaciones de los niveles séricos de estas citoquinas entre los ratones  $\text{Cox-2}^{+/+}/\text{ApoE}^{-/-}$  y  $\text{Cox-2}^{-/-}/\text{ApoE}^{-/-}$ , cabe resaltar que, si bien los niveles de MCP-1 en suero aumentan tras 10 semanas de tratamiento en los ratones  $\text{Cox-2}^{-/-}/\text{ApoE}^{-/-}$ , los valores máximos alcanzados en este grupo de animales son significativamente menores que en los ratones  $\text{Cox-2}^{+/+}/\text{ApoE}^{-/-}$ . Respecto al resto de citoquinas, no encontramos diferencias significativas entre los niveles obtenidos entre los dos grupos de animales (**Figura 30**).



**Figura 30. Niveles séricos de citoquinas en ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$  y  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$  alimentados con dieta aterogénica durante 5 o 10 semanas.**

Los niveles de citoquinas se analizaron en sueros de ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$  y  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$  antes de la administración de dieta (n=7) y después de 5 semanas (n=5) o 10 semanas de dieta aterogénica (n=10), mediante citometría de flujo (ensayo CBA, ver materiales y métodos). Los datos se expresan como veces de inducción con respecto a los valores presentes en sueros obtenidos antes de comenzar la alimentación con la dieta aterogénica (0). \*p<0.05 \*\*p<0.01 con respecto a la dieta estándar ##p<0.01 con respecto al valor en los ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$ .

## 9. Análisis del metabolismo y transporte de lípidos en ratones $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$ .

Uno de los parámetros esenciales en el desarrollo de la aterosclerosis es el valor de los niveles de lípidos circulantes en sangre. Éstos se midieron en sueros de ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$  y  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$  obtenidos antes y después de la dieta, en los que se determinaron los niveles de triglicéridos, colesterol total así como las fracciones de HDLs y LDL/VLDLs. Los resultados obtenidos tras el análisis sérico de estos parámetros en el grupo de ratones alimentados con dieta aterogénica durante 10 semanas se muestran en la **Tabla 1**. No se apreciaron diferencias significativas en los niveles lipídicos antes de la administración de la dieta grasa entre los ratones  $Cox-2^{+/+}/Apoe^{-/-}$  y  $Cox-2^{-/-}/Apoe^{-/-}$ . Tras la administración de la dieta aterogénica se produjo un aumento en los niveles de triglicéridos y de colesterol en ambos grupos de animales, si bien los



niveles finales de triglicéridos y colesterol total fueron significativamente menores en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

En cuanto a la medida de las fracciones LDL/VLDLs se observó que, sus niveles no sufrieron cambios significativos entre los valores anteriores o posteriores a la administración de la dieta, ni existieron diferencias entre los dos grupos de ratones. Sin embargo, sí que se apreciaron cambios en la fracción HDL entre los dos grupos de animales, de tal forma que los niveles de HDL en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* fueron significativamente superiores a los presentes en los ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* tras la administración de la dieta aterogénica.

	PREDIETA		POSTDIETA	
	<i>Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i>	<i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i>	<i>Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i>	<i>Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup></i>
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	98,24 ± 35,31 n=6	72,23 ± 28,28 n=6	212,7 ± 23,68 n=11	119,9 ± 1,060 * n=10
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	467,7 ± 61,11 n=9	433,1 ± 43,39 n=7	787 ± 43,75 n=9	604,3 ± 45,47 * n=7
<b>HDL (mg/dl)</b>	16,40 ± 1,611 n=3	25,70 ± 2,723 n=3	20,56 ± 3,988 n=4	35,71 ± 3,137 * n=5
<b>LDL/VLDL (mg/dl)</b>	53,01 ± 1,628 n=3	45,36 ± 6,034 n=3	46,38 ± 4,476 n=4	48,45 ± 1,099 n=5

**Tabla 1. Niveles séricos de colesterol total, HDLs LDLs, VLDLs y triglicéridos en ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* alimentados con dieta aterogénica durante 10 semanas.**

Análisis de la concentración de colesterol, triglicéridos, HDLs y LDL/VLDLs en sueros de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* antes de la administración de dieta (predieta) y después de 10 semanas de dieta aterogénica (postdieta). Para las determinaciones de HDLs y LDL/VLDLs se mezclaron sueros de varios ratones con el fin de obtener el volumen necesario de suero para la separación por gradiente según el kit. Los datos se presentan como media de las concentraciones ± SD. \*p<0.05 respecto al valor de *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

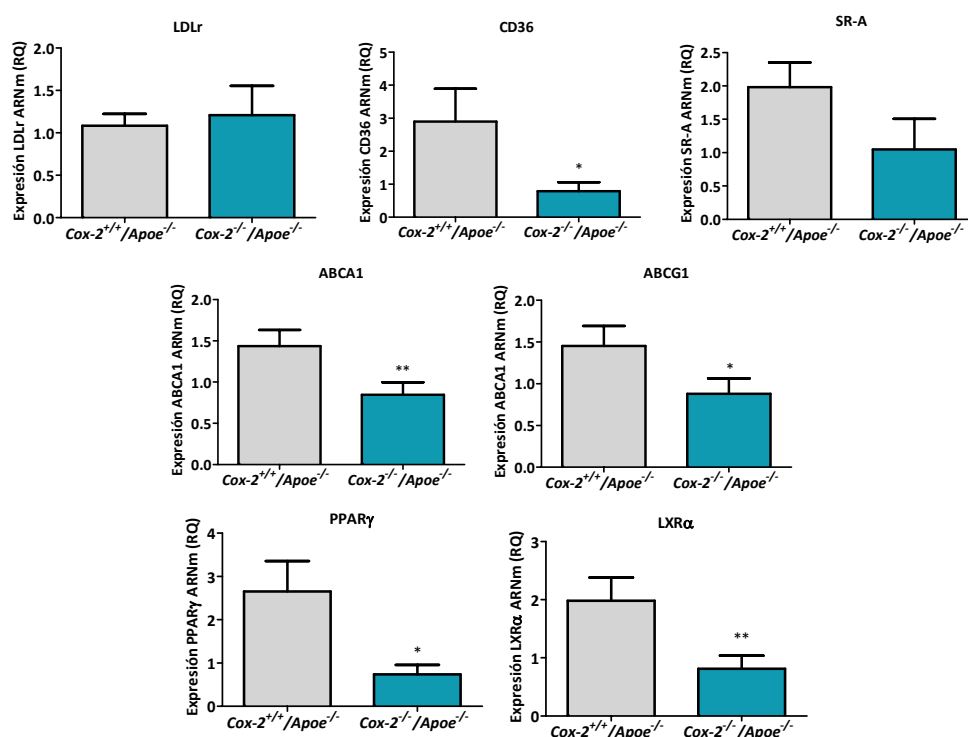
Estas diferencias en el perfil lipídico en ausencia o presencia de COX-2 podrían contribuir a explicar el hecho de que los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>* carentes de COX-2 presentaran una menor incidencia en la formación de las placas de ateroma. Por ello, procedimos a analizar en detalle la posible influencia de COX-2 sobre el metabolismo y transporte de lípidos a través del análisis de la expresión de genes implicados en estos procesos en diferentes tejidos (aorta, hígado y macrófagos) así como mediante el estudio del flujo de salida de colesterol en macrófagos.

Los niveles plasmáticos de colesterol son un factor determinante en el establecimiento y progresión de la aterosclerosis, estando regulados mediante el



denominado transporte reverso de colesterol, por el cual, el colesterol es transportado desde la pared vascular al hígado para su excreción. Una parte esencial de este proceso lo constituye el flujo de salida de colesterol por el cual, el colesterol acumulado es retirado de los macrófagos de la pared vascular. Entre los diferentes genes analizados en este trabajo relacionados con el transporte de colesterol y su entrada y salida en los diferentes tejidos se encuentran los receptores *scavenger* CD36 y SR-A, el receptor de LDLs LDLr, transportadores como ABCA1 y ABCG1, y miembros de la superfamilia de receptores nucleares dependientes de ligando PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$ , relacionados con la regulación de la expresión genes implicados en la homeostasis de lípidos.

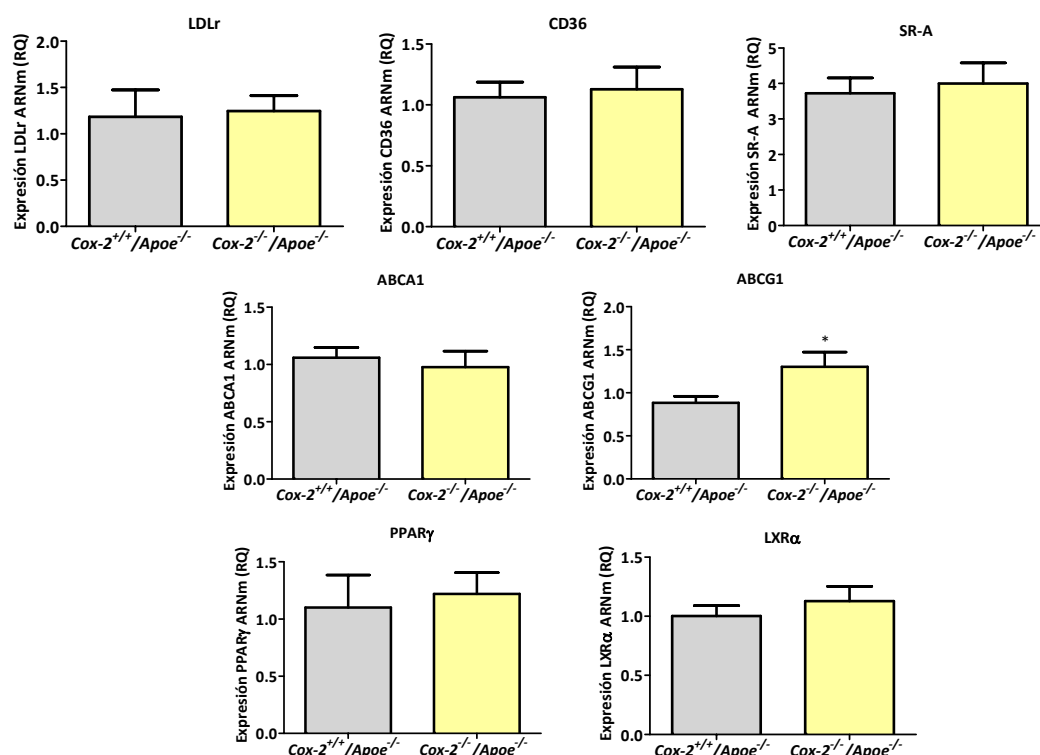
El análisis mediante *RT-PCR* cuantitativa de la expresión de estos genes, en las aortas de los ratones sometidos a dieta hipercolesterolémica durante 10 semanas, puso de manifiesto unos menores niveles de expresión de CD36, SR-A, ABCA1, ABCG1, PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  en los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> con respecto a los *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>, sin que se observaran diferencias en cuanto a la expresión de LDLr (**Figura 31**).



**Figura 31. Análisis de la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en aortas de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> alimentados con dieta aterogénica.**

La expresión de LDLr, CD36, SR-A, ABCA1, ABCG1, PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$  se analizó mediante *RT-PCR* cuantitativa en extractos procedentes de aortas de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> sometidos a 10 semanas de dieta aterosclerótica. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los niveles de ARNr 18S y se expresaron como media de la RQ  $\pm$  SD. n=7 por grupo. \*p<0.05 \*\*p<0.01 respecto a los ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>.

Puesto que el hígado es un órgano clave en el transporte reverso del colesterol, analizamos a su vez la expresión de estos genes en órganos obtenidos de los mismos grupos de ratones. La comparación entre los valores obtenidos muestra que no existen diferencias significativas en la expresión de los genes analizados salvo en el caso de ABCG1, el cual presenta unos niveles mayores de expresión en los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> (Figura 32).



**Figura 32. Análisis de la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en hígados de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> alimentados con dieta aterogénica.**

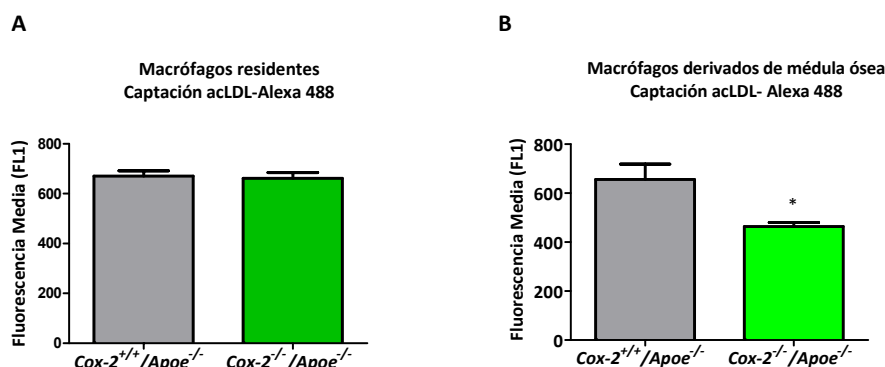
La expresión de LDLr, CD36, SR-A, ABCA1, ABCG1, PPARγ y LXRα se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en extractos procedentes de hígados de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> sometidos a 10 semanas de dieta ateroesclerótica. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los niveles de ARNr 18S y se expresaron como media de la RQ ± SD. n=11 por grupo. \*p<0.05 respecto a los ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup>.

### 9.1. Captación y flujo de salida de colesterol en macrófagos deficientes en COX-2.

Los macrófagos tienen un papel muy importante en el transporte del colesterol y en el desarrollo de la aterosclerosis. Éstos son capaces de internalizar lipoproteínas modificadas, convirtiéndose así en células espumosas. Además de captar estas lipoproteínas de baja densidad modificadas principalmente por oxidación (oxLDL) o acetilación (acLDL), participan en el transporte reverso como células esenciales en el

flujo de salida de colesterol. La salida de colesterol tiene lugar, entre otros mecanismos, a través de transportadores como ABCA1 y ABCG1, que promueven el transporte reverso del colesterol por el torrente sanguíneo a través de aceptores como HDLs y ApoA-I, para su metabolismo final en el hígado (Fitzgerald et al., 2010; Ye et al., 2011).

La capacidad de captación de acLDL por parte de macrófagos de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* se determinó mediante el uso de macrófagos peritoneales residentes y macrófagos derivados de médula ósea obtenidos de animales sometidos a dieta aterogénica durante 10 semanas. Estas células se incubaron con acLDLs conjugadas con el reactivo fluorescente Alexa 488 y la capacidad de las células de captar acLDLs se determinó por citometría de flujo. El porcentaje de células marcadas con acLDL-Alexa488 fue del orden del 90% en ambos grupos de animales. Los valores de intensidad de fluorescencia media fueron similares entre ambos grupos de ratones en el caso de los macrófagos residentes, mientras que, en macrófagos derivados de médula ósea, se observó unos valores menores de fluorescencia en aquéllos provenientes de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* (Figura 33).

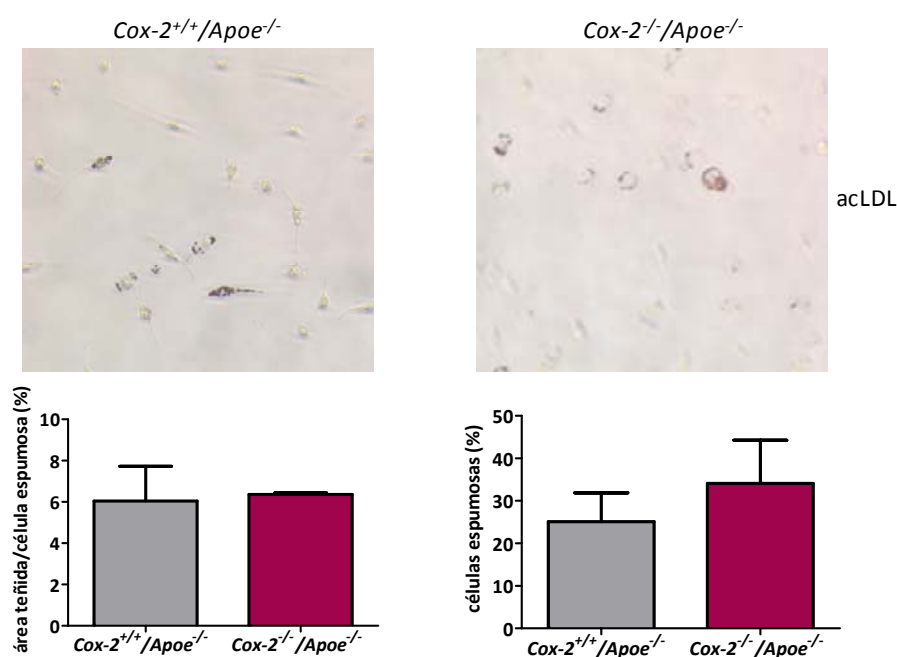


**Figura 33. Captación acLDL por macrófagos procedentes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* mantenidos a dieta aterogénica durante 10 semanas.**

Macrófagos peritoneales residentes (**A**) de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* (n=7) y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* (n=5) o derivados de médula ósea (**B**) (n=3), se incubaron durante 2-3h con 1 µg/ml de acLDL marcadas con Alexa488 y posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Los resultados están expresados como fluorescencia media ± SD. \*p<0.05 respecto a los ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

Como complemento a estos estudios, analizamos la capacidad de incorporar acLDLs por parte de macrófagos peritoneales residentes tras la incubación con acLDLs y posterior tinción con ORO. Los resultados obtenidos con células provenientes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* sometidos a dieta aterogénica durante 5 semanas, no mostraron diferencias entre ambos grupos de animales, ya fuera sobre el

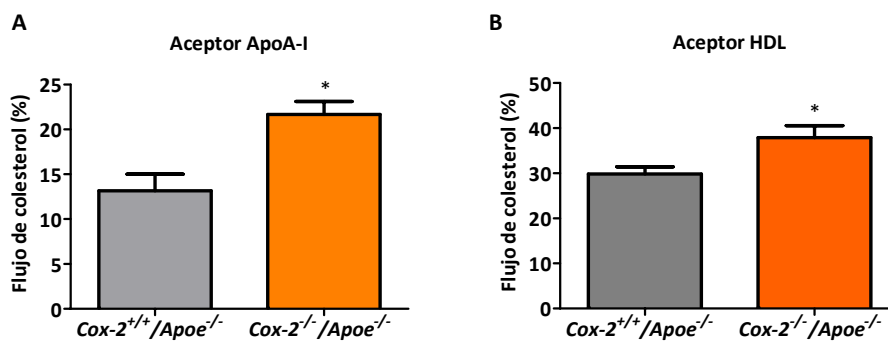
porcentaje de células teñidas con ORO o sobre el área teñida en cada célula (**Figura 34**).



**Figura 34.** Formación de células espumosas por macrófagos residentes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* mantenidos en dieta aterogénica durante 5 semanas.

Los macrófagos peritoneales residentes de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* (n=3) se incubaron durante 24h con 25 µg/ml de acLDL. Pasado ese tiempo se tiñeron con ORO y se realizaron fotografías a 20x en un microscopio óptico invertido. De las imágenes se analizó el área teñida de ORO por célula (gráfica izquierda) y el porcentaje de células teñidas (gráfica derecha). Se analizaron al menos 10 campos por ratón. Resultados representados como porcentaje del área teñida ± SD.

Otros abordajes experimentales permiten determinar la capacidad de los macrófagos, ya no de captar e incorporar LDLs, sino de retirar colesterol desde su interior hacia el torrente sanguíneo, en lo que se denomina flujo de salida de colesterol. Para ello, macrófagos peritoneales residentes obtenidos de ratones sometidos a 10 semanas de dieta aterogénica, se incubaron con colesterol marcado radiactivamente tras lo cual, se añadieron al medio de cultivo aceptores de colesterol; ya fuera apoA-I, como aceptor de colesterol asociado al transportador ABCA1; o HDLs como aceptor del colesterol asociado a ABCG1 (Ye *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos mostraron que los macrófagos de los ratones *Cox2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* presentaban una mayor capacidad de retirar colesterol que los procedentes de ratones *Cox2<sup>+/+</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*, tanto en presencia de ApoA-I como de HDL (**Figura 35**).



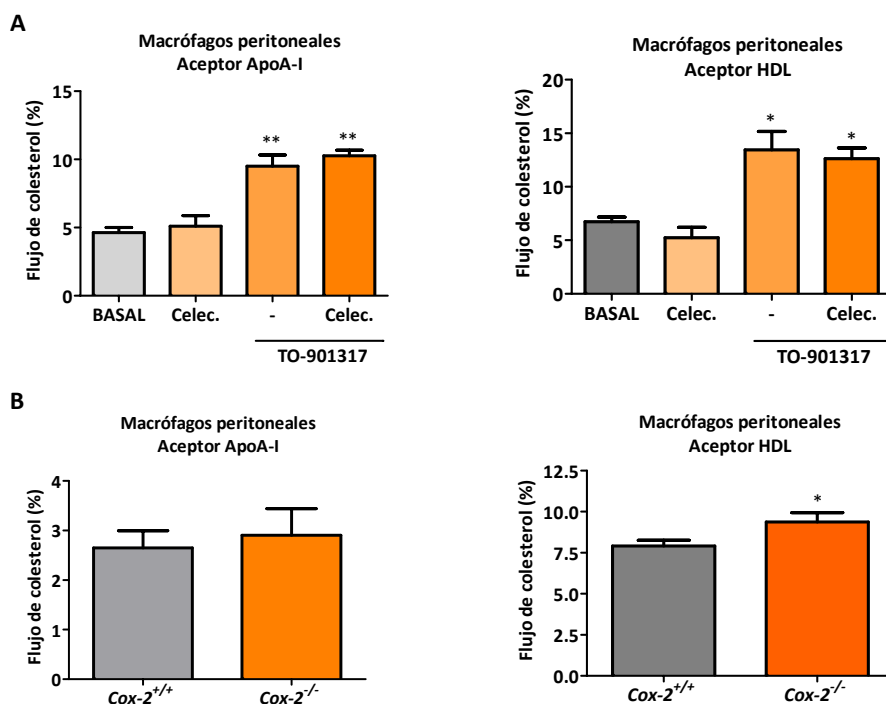
**Figura 35. Flujo de salida de colesterol en macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup> alimentados durante 10 semanas con dieta aterogénica.**

Los macrófagos peritoneales fueron incubados con 0,5  $\mu$ Ci/ml colesterol-[<sup>3</sup>H] durante 48h e incubados posteriormente con los aceptores de colesterol ApoA-I (A) o HDL (B). Los resultados se expresan como la media de los porcentajes de flujo de colesterol en cada grupo  $\pm$  SD. (n=3 en cada grupo experimental) \*p<0.05

## 10. Implicación de COX-2 en el transporte de lípidos en macrófagos.

Las diferencias observadas en los resultados obtenidos para la homeostasis de lípidos en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> carentes de COX-2 en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> que expresaban esta enzima, apuntaban a un posible papel de la COX-2 en estos procesos. De tal forma, procedimos a analizar con más detalle la posible influencia de COX-2 en la regulación de la homeostasis de lípidos, ya fuera mediante el uso de macrófagos deficientes en COX-2 o tras la inhibición de la actividad COX-2 con un inhibidor selectivo como el celecoxib.

En primer lugar se analizó la capacidad de los macrófagos peritoneales, extraídos tras inyección de tioglicolato, procedentes de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup> o *Cox-2*<sup>+/+</sup> (ambos en un contexto *ApoE*<sup>+/+</sup> y alimentados con dieta estándar) de promover el flujo de salida de colesterol en presencia de aceptores ApoA-I o HDL. Como se muestra en la **figura 36A**, los macrófagos carentes de COX-2 presentaron una ligera tendencia de promover un mayor flujo de salida de colesterol, estadísticamente significativo en el caso de la presencia de HDL como aceptor. Sin embargo, la inhibición de la actividad COX-2 con celecoxib en macrófagos de ratones *silvestres* no produjo un efecto significativo sobre el flujo de salida de colesterol, ya fuera en situación basal, o tras el tratamiento de los macrófagos con el ligando agonista de LXR, TO-901317, el cual promueve un aumento en el flujo de colesterol (**Figura 36B**).

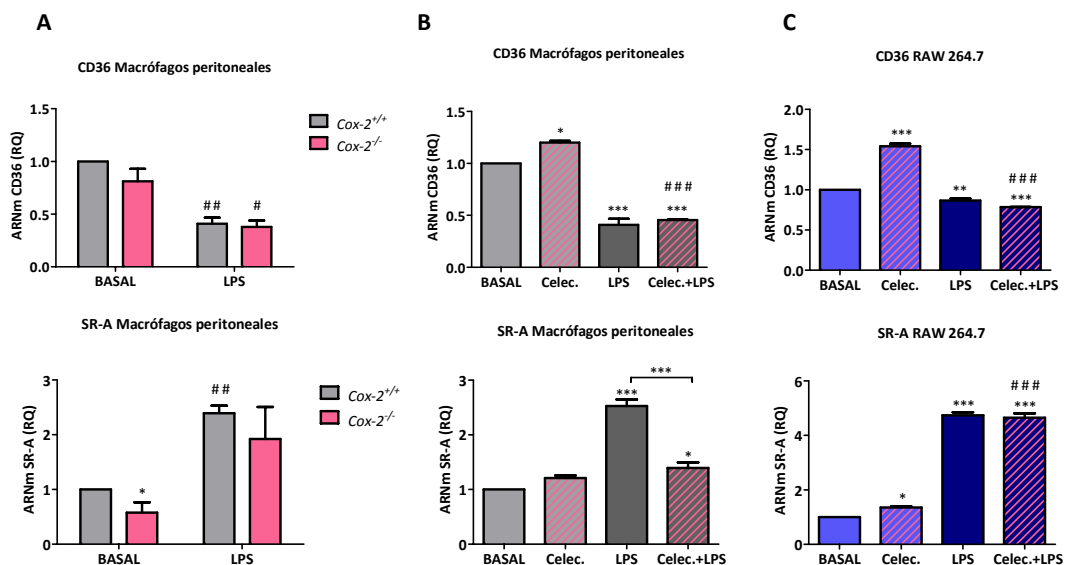


**Figura 36. Flujo de salida de colesterol en macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* alimentados durante 10 semanas con dieta aterogénica.**

Los macrófagos peritoneales fueron incubados con 0,5  $\mu$ Ci/ml colesterol-[<sup>3</sup>H] durante 48h e incubados posteriormente con los aceptores de colesterol ApoA-I (A) o HDL (B). Los resultados se expresan como la media de los porcentajes de flujo de colesterol en cada grupo  $\pm$  SD. (n=3 en cada grupo experimental) \*p<0.05

Por otro lado, decidimos estudiar la relación entre COX-2, la activación de macrófagos y la expresión de genes involucrados en la homeostasis de lípidos, como los anteriormente analizados en los tejidos de ratones *COX-2<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>*. Para ello, empleamos macrófagos peritoneales extraídos con tioglicolato procedentes de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>*, macrófagos peritoneales procedentes de ratones *silvestres* o células de la línea RAW 264.7 tratados con el inhibidor selectivo de COX-2, celecoxib, y sus correspondientes controles. Estas células se cultivaron en presencia o ausencia de LPS. Los resultados obtenidos en las *RT-PCRs* cuantitativas para los genes analizados en las diferentes células y tratamientos se muestran en las **figura 37**.

En primer lugar analizaremos los resultados obtenidos acerca de la expresión de genes relacionados con la captación de LDLs modificadas, como CD36 y SR-A, en los diferentes tipos celulares y tras los diversos tratamientos (**figura 37.1**).



**Figura 37.1. Estudio del papel de COX-2 sobre la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en células RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>.**

Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de CD36 y SR-A en macrófagos peritoneales inducidos con tioglicolato en ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup> (A), en macrófagos de ratones silvestres (B) y en células RAW 264.7 (C). Las células se incubaron con LPS (2 µg/ml) y/o celecoxib (Celec) (1 µM), según se indique, durante 24h. Los datos obtenidos se expresan como media de RQ ± SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNr 18S. En A y B n=6 ratones por punto. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 respecto al valor obtenido en los macrófagos *Cox-2*<sup>+/+</sup> en A, o respecto al valor en basal, en B y C. Mediante una barra se indica del mismo modo la diferencia respecto al valor en ausencia de Celec, en B. #p<0.05 ##p<0.01 ###p<0.001 respecto a la ausencia de LPS en A, o respecto al mismo estímulo sin LPS en B y C.

Atendiendo al efecto de la activación de los macrófagos con LPS sobre la expresión de estos genes, se observó que, mientras que CD36 disminuye su expresión de forma significativa en respuesta a LPS, la expresión de SR-A aumenta de forma sustancial, ocurriendo, en ambos casos, tanto en macrófagos peritoneales de animales silvestres como en los procedentes de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>, así como en células RAW 264.7.

El análisis de los resultados comparando los niveles de expresión en macrófagos controles o carentes de COX-2, o tras su inhibición con celecoxib mostró que la ausencia de COX-2 no parece influir en la expresión de CD36, si bien, aunque moderada, se apreció una mayor expresión tras el tratamiento con celecoxib en ausencia de LPS en los macrófagos de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> y en las células RAW 264.7. En cuanto a la expresión de SR-A, tan sólo se apreciaron ligeras diferencias entre los diferentes grupos, con una menor expresión en los macrófagos de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup> y una reducción de la inducción mediada por LPS en los macrófagos *Cox-2*<sup>+/+</sup>.

En la **figura 37.2**, se presentan los resultados obtenidos para aquellos genes relacionados con el flujo de salida de colesterol del macrófago (ABCA1 y ABCG1) y el transporte de lípidos (apoE).

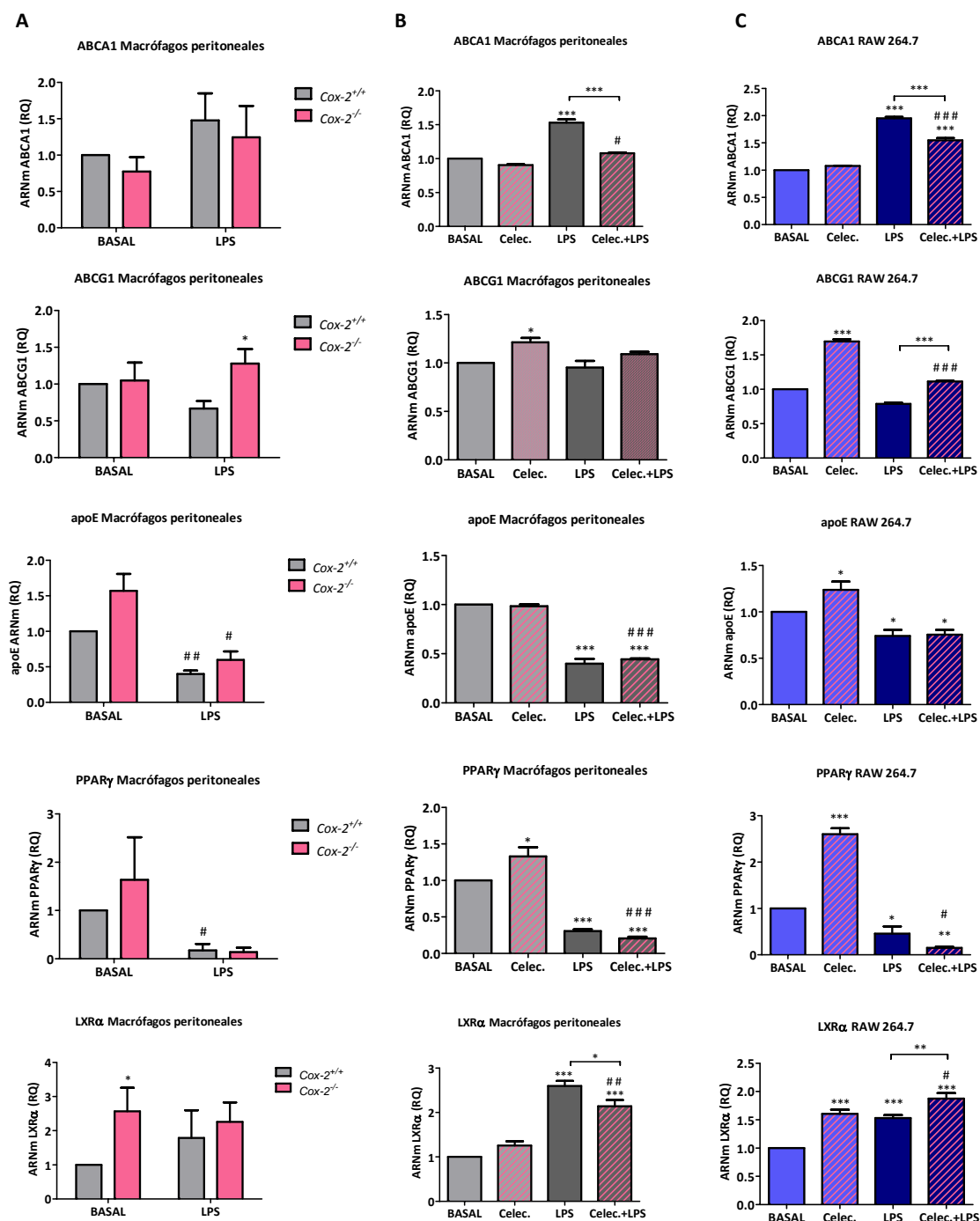
La activación con LPS indujo la expresión de ABCA1 en todos los tipos celulares analizados, mientras que no se apreciaron alteraciones significativas en la expresión de ABCG1 en respuesta a LPS en ningún caso. Por su parte, la expresión de apoE se vio reducida de forma significativa en todos los casos tras el tratamiento con LPS.

De los resultados obtenidos, atendiendo a la ausencia de COX-2 o al tratamiento con celecoxib, cabe destacar la disminución tras el tratamiento con este inhibidor, de la inducción de la expresión de ABCA1 promovida por LPS, tanto en macrófagos peritoneales *Cox-2<sup>+/+</sup>* como en células RAW 264.7. Por el contrario, en el caso de ABCG1 observamos que su expresión es ligeramente mayor en ausencia de COX-2 o tras su inhibición por celecoxib. La expresión de apoE fue mayor en los macrófagos carentes de COX-2, mientras que en presencia de celecoxib tan sólo se apreció una inducción significativa en las células RAW 264.7 en ausencia de LPS.

En estas células también se estudió la expresión de los receptores nucleares PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$ . Analizando la influencia del tratamiento con LPS sobre la expresión de estos genes, observamos un efecto diferencial, de tal forma que el LPS presentó un claro efecto inductor en el caso del LXR $\alpha$ , mientras que, en el caso de PPAR $\gamma$  sus niveles de expresión disminuyeron en respuesta a LPS de manera significativa en todos los tipos celulares.

Sin embargo, las variaciones en la expresión de ambos genes fueron similares en cuanto a la influencia sobre éstas de la COX-2. De tal forma, los resultados obtenidos mostraron unos mayores niveles de expresión de PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  en los macrófagos de los ratones deficientes en COX-2. Así mismo, el tratamiento con celecoxib promovió una inducción de su expresión que se pudo observar, si bien a diferentes niveles, tanto en macrófagos peritoneales como en células RAW 264.7.

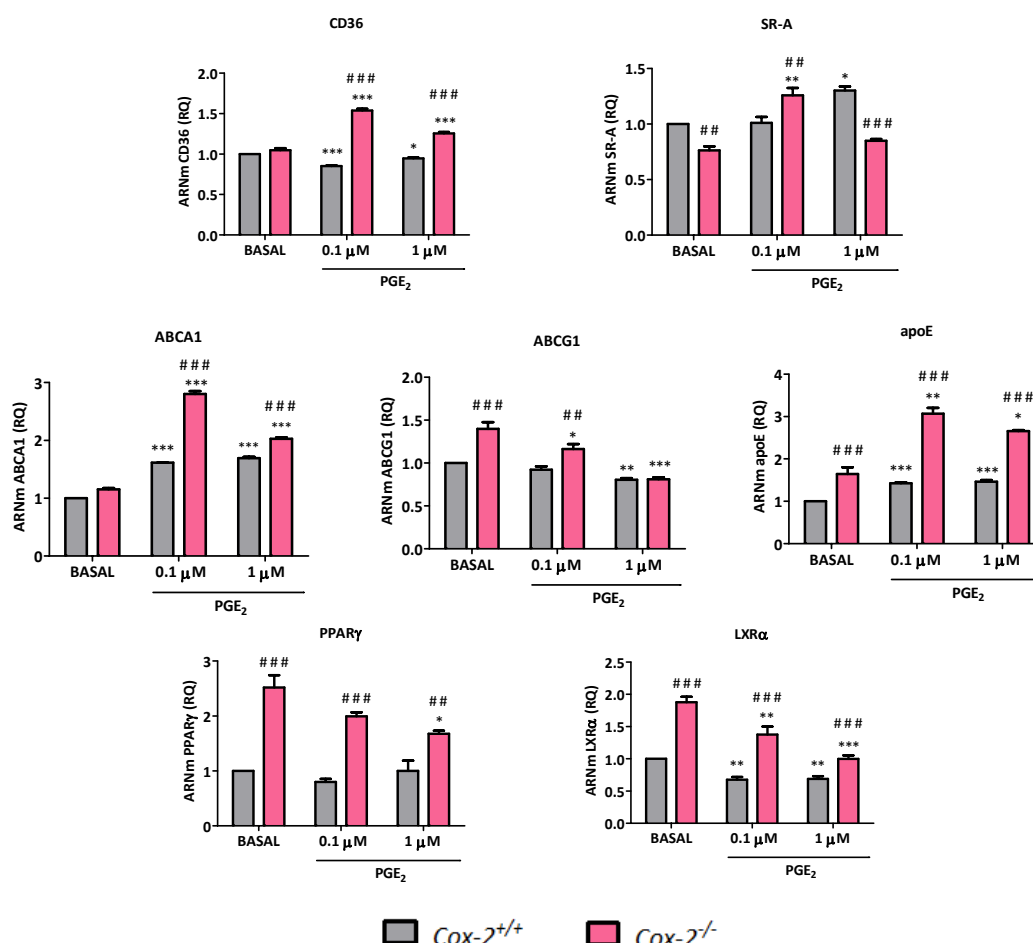




**Figura 37.2. Estudio del papel de COX-2 sobre la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en células RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>.**

Análisis por *RT-PCR* cuantitativa de la expresión de ABCA1, ABCG1, apoE, PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  en macrófagos peritoneales inducidos con tioglicolato en ratones *Cox-2*<sup>+/-</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup> (A), en macrófagos de ratones silvestres (B) y en células RAW 264.7 (C). Las células se incubaron con LPS (2  $\mu$ g/ml) y/o celecoxib (Celec) (1  $\mu$ M), según se indique, durante 24h. Los datos obtenidos se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNr 18S. En A y B n=6 ratones por punto. \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 respecto al valor obtenido en los macrófagos *Cox-2*<sup>+/-</sup> en A, o respecto al valor en basal, en B y C. Mediante una barra se indica del mismo modo la diferencia respecto al valor en ausencia de Celec, en B y C. #p<0.05 ##p<0.01 ###p<0.001 respecto a la ausencia de LPS en A, o respecto al mismo estímulo sin LPS en B y C.

A continuación analizamos el efecto de la PGE<sub>2</sub>, uno de los principales productos derivados de la actividad COX-2 en macrófagos, sobre la expresión de los diferentes genes estudiados, con el fin de determinar si existía una relación entre las acciones de esta PG, con los efectos observados en ausencia de COX-2 o tras su inhibición. Para ello, se realizaron ensayos de *RT-PCR* cuantitativa con ARNs obtenidos de macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup> tratados con PGE<sub>2</sub> (0,1 y 1  $\mu$ M) (**Figura 38**).



**Figura 38. Análisis del efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup>**

La expresión de CD36, SR-A, ABCA1, ABCG1, apoE, PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  en macrófagos peritoneales inducidos con tioglicolato en ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> y *Cox-2*<sup>-/-</sup> tratados con tioglicolato, se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los macrófagos se incubaron en presencia o ausencia de PGE<sub>2</sub> (0,1 y 1  $\mu$ M) durante 24 horas. Los datos obtenidos se expresan como media de RQ  $\pm$  SD con respecto al basal y normalizados por los niveles de ARNr 18S n=6 por grupo \*p<0.05. \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 respecto al valor obtenido en los macrófagos *Cox-2*<sup>+/+</sup> #p<0.05 ##p<0.01 ###p<0.001 respecto al basal de su correspondiente grupo.

Como vimos anteriormente, la expresión de CD36 no mostró diferencias entre macrófagos *Cox-2<sup>+/+</sup>* y *Cox-2<sup>-/-</sup>*, si bien, la adición de PGE<sub>2</sub> produjo un aumento significativo de la expresión de CD36 en estos últimos. En cuanto a la expresión de SR-A, ligeramente menor en las células *Cox-2<sup>-/-</sup>*, incrementó ligeramente su expresión en respuesta a diferentes dosis de PGE<sub>2</sub> en unos u otros macrófagos.

En cuanto a la expresión de ABCA1, con niveles similares en ambos tipos de macrófagos en situación basal, el tratamiento con PGE<sub>2</sub> incrementó sustancialmente su expresión, y de mayor modo en los macrófagos *Cox-2<sup>-/-</sup>*. La PGE<sub>2</sub> tuvo un efecto inductor similar en el caso de apoE. Por el contrario, esta PG tuvo un efecto inhibitor sobre la expresión de ABCG1, el cual presentaba unos niveles mayores en los macrófagos *Cox-2<sup>-/-</sup>* en situación basal.

En cuanto a la expresión de los receptores PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$ , cuyos niveles, como vimos anteriormente, estaban incrementados en situación basal en los macrófagos procedentes de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>*, el tratamiento con PGE<sub>2</sub> tuvo un efecto inhibitor. De tal manera, la expresión de estos receptores disminuyó de forma dependiente de la dosis de PGE<sub>2</sub>, siendo más evidente en el caso de los macrófagos de los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>*.

## DISCUSIÓN



## I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR CALCIO EN MACRÓFAGOS.

### 4. Efecto del calcio y el LPS en la regulación de COX-2.

El macrófago es una célula inmune clave en el proceso inflamatorio, incluyendo patologías que cursan con una inflamación crónica como la aterosclerosis (Boyle, 2005). Su activación por diferentes estímulos proinflamatorios, como el LPS, provoca la inducción de diferentes vías de señalización que llevan a la producción de citoquinas como IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ; quimioquinas, y enzimas que actúan como mediadores inflamatorios, entre ellas iNOS o las COX (Cassetta *et al.*, 2011; Ortega-Gómez *et al.*, 2013). La acción de las enzimas COX-2 y mPGES-1 lleva a la producción de PGE<sub>2</sub>, que ejerce una importante función inmunomoduladora (Matsumoto *et al.*, 1997). La acción del LPS sobre la activación de los macrófagos está bien descrita y se sabe que ejerce su función señalizando principalmente a través del receptor TLR4 (Takeuchi y Akira, 2010), provocando la activación de diferentes cascadas de señalización que acaban induciendo la expresión de genes diana, como COX-2 y mPGES-1. Sin embargo, aunque algunos trabajos apuntan a la activación de los macrófagos por Ca<sup>2+</sup> (Buchmüller-Rouiller y Mauël, 1991; Johnson y Torres, 1985; Onozaki *et al.*, 1983), el mecanismo de acción y cómo afecta a la inducción de enzimas como COX-2, mPGES-1 e iNOS, o a citoquinas proinflamatorias como las citadas anteriormente, no ha sido bien descrito hasta la fecha.

Nuestros estudios, realizados en líneas celulares monocito/macrófago de ratón (RAW 264.7) y humano (THP-1), así como en macrófagos peritoneales de ratón, demuestran que los ionóforos de Ca<sup>2+</sup> son capaces de inducir la expresión de COX-2 por sí mismos y que, basándonos en la cinética de ionóforo A23187, lo hacen muy tempranamente. En algunos casos, y especialmente en las células THP-1, este incremento por la acción de los ionóforos fue incluso mayor que la obtenida con tratamientos con activadores clásicos muy potentes como el LPS o el PMA. Aunque este mayor efecto en las THP-1 podría deberse a una participación del Ca<sup>2+</sup> en la diferenciación de estas células similar a lo descrito en la línea celular monocítica humana U937 (Floto *et al.*, 1996), otros resultados, que discutiremos más adelante, muestran cómo las THP-1 son más sensibles a la regulación transcripcional de genes dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Cabe destacar, que también encontramos diferencias entre la inducción de la expresión de COX-2 provocada por los dos ionóforos de Ca<sup>2+</sup> entre sí a nivel de ARNm y proteína, tanto en RAW 264.7 como en THP-1, siendo mayor la inducción generada por Ion respecto a la de Io. En plaquetas humanas, comparando el

aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular generado por ambos, el generado por lo era un 20-40% inferior que el del ion en todas las concentraciones ensayadas (Lages y Weiss, 1995). Así, aunque la lo une cationes divalentes en una estequiometria 1:1, y el ion lo hace 2:1 (Wang *et al.*, 1998), sus acciones en un sistema biológico, no dependerían tanto de su capacidad de intercambio iónico sino de la activación de sistemas transportadores de calcio nativos, sobre los que el pH y la concentración de ionóforo jugarían un papel fundamental (Dedkova EN, 2000; Erdahl et al., 1994). Pensamos que en macrófagos, el ion podría ser más eficaz a la hora de activar canales como los CRAC, que facilitan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, o bien produce una mejor señal para movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que posteriormente lleve a la apertura de estos canales.

Hemos observado además, que la inducción de la expresión de COX-2 mediada por LPS y por  $\text{Ca}^{2+}$ , es cooperativa, traducándose además en una mayor producción de  $\text{PGE}_2$ . En este sentido, se ha descrito una cooperación similar entre LPS y  $\text{Ca}^{2+}$  en la inducción de iNOS y que lo hacen por cascadas intracelulares diferentes (Raddassi *et al.*, 1994). Esto no sólo estaría de acuerdo con nuestros resultados en COX-2, sino con los obtenidos para otros genes como la propia iNOS, IL-6, TNF, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , entre otros.

#### **5. La vía de señalización de $\text{Ca}^{2+}$ /calcineurina/NFAT en la inducción de la expresión génica en macrófagos.**

Una vía muy importante de regulación génica dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , es la mediada por el factor de transcripción NFAT, en cuyo control juega un papel clave la Cn (Crabtree y Olson, 2002; Hogan *et al.*, 2003). La actividad de esta enzima está regulada directamente por  $\text{Ca}^{2+}$  y por la proteína CaM, y su acción puede inhibirse empleando inmunosupresores como CsA y FK506 (Martinez-Martinez y Redondo, 2004). El papel de NFAT en la regulación de la respuesta adaptativa es bien conocido y hasta hace pocos años su participación en la respuesta innata no estaba descrita. Sin embargo, varias publicaciones recientes han desvelado su acción en células dendríticas y macrófagos (Buxadé *et al.*, 2012; Elloumi *et al.*, 2012; Goodridge *et al.*, 2007; Minematsu *et al.*, 2011). Nosotros encontramos que la inducción de la actividad transcripcional de COX-2 y la producción de  $\text{PGE}_2$  en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  es sensible a CsA. Además, mediante un *array* identificamos otros genes relacionados con el proceso inflamatorio, que una vez analizados presentaban el mismo comportamiento, entre los

que destacamos iNOS e IL-6, si bien la respuesta de genes como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , M-CSF y TNF también fue importante.

Se ha demostrado que el receptor Dectin-1, que juega un papel esencial en el reconocimiento de hongos patógenos, activa NFAT y produce un aumento de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, entre otros, produciéndose una disminución en presencia de CsA en células mieloides (Goodridge *et al.*, 2007). Sin embargo, al contrario de lo mostrado en nuestros resultados, no observaron una inhibición de la inducción de IL-6 ni de TNF $\alpha$  en presencia de CsA. Es probable que esto se deba a que Ion sería capaz de movilizar y mantener una señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular suficiente para la permanencia de NFAT en el núcleo y poder transcribir estos genes, cosa que la estimulación vía Dectin-1 o TLR2 probablemente no conseguiría.

De acuerdo con otras publicaciones, detectamos la presencia de todos los miembros de NFAT, excepto NFATc4 (Buxadé *et al.*, 2012; Fric *et al.*, 2012; Greenblatt *et al.*, 2010), en las células monocíticas RAW 264.7. Además, mediante la expresión de un mutante de NFAT que actúa como dominante negativo, demostramos el papel fundamental de NFAT sobre la inducción de la actividad transcripcional de COX-2 en macrófagos en respuesta a Ca<sup>2+</sup>. En linfocitos T, NFAT ejerce su función tras una desfosforilación que le permite su translocación al núcleo (Kiani *et al.*, 2000), hecho que también probamos en macrófagos mediante inmunofluorescencia donde vimos que Ion provocaba una translocación al núcleo y la presencia de CsA impedía dicha acción. Más interesantes fueron los resultados obtenidos mediante el análisis de la expresión de NFATc2 en la fracción nuclear y citosólica de células RAW 264.7 y THP-1, donde encontramos no sólo que se producía dicha translocación al núcleo, sino que en las THP-1 el Ion provocaba una translocación mucho más eficiente, mostrándose una clara disminución de NFAT en la fracción citoplásmica, menos evidente en las RAW 264.7. Además, en las células THP-1 encontramos que la acción de la CsA producía un aumento de la expresión de NFATc2 en la fracción citoplásmica, debida seguramente a un estado hiperfosforilado del factor de transcripción, que en las células RAW 264.7 no se llega a apreciar. Estas diferencias en la capacidad de translocación de NFAT entre ambos tipos celulares en respuesta a los mismos estímulos nos ayuda a entender porqué la acción del Ion en estas células produce un aumento tan elevado de la expresión de COX-2, ya que parece que la regulación de la expresión génica dependiente de NFAT en células THP-1 tendría un papel crucial. Por el contrario, algunos artículos apuntan a una presencia constante de NFAT en el núcleo en macrófagos (Conboy *et al.*, 1999; Minematsu *et al.*, 2011); Este último describe que

NFATc3 y NFATc4, están constitutivamente localizados en el núcleo de macrófagos de ratón derivados de médula ósea, mientras que NFATc1 y NFATc2 se encontrarían en el citoplasma y migrarían al núcleo en respuesta a  $\text{I}\alpha$ , lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados respecto a NFATc2, donde además encontramos que el tratamiento con LPS,  $\text{I}\alpha$  o ambos, puede producir la formación de complejos de unión de NFAT al ADN. Todos estos resultados, nos permiten inferir que NFAT está involucrado en la activación transcripcional de COX-2 y posiblemente en la de otros genes relacionados con la inflamación como iNOS, IL-6, M-CSF, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Otorgando así a NFAT, un papel en la regulación de la respuesta inmune innata en el proceso inflamatorio.

Existen algunas publicaciones que dan un papel al  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de IL-6 (Marriott *et al.*, 1998; Sattayaprasert *et al.*, 2005); mientras que otras ya relacionan la expresión de iNOS con Cn y CaM en macrófagos y cardiomiocitos (Hämäläinen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Obasanjo-Blackshire *et al.*, 2006), pero ninguna describe a NFAT como mediadora de esa acción en macrófagos, aunque sí describen una vía NFAT en cardiomiocitos. Curiosamente, según nuestros resultados mPGES-1 no estaría regulada por CsA, al menos en células RAW 264.7, pero sí en células THP-1. Es muy probable que la activación de mPGES-1 no sea dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en células RAW 264.7 y que provenga de la activación de NF- $\kappa$ B u otro factor de transcripción, como ya ha sido descrito (Catley *et al.*, 2003; Díaz-Muñoz *et al.*, 2010). Sin embargo, en THP-1, puesto que el  $\text{Ca}^{2+}$  puede jugar un papel importante en la activación/diferenciación de estas células y hemos demostrado que NFAT podría jugar un papel más importante en la regulación transcripcional de genes en esta línea celular, puede que mPGES-1 sí que esté sujeta a una regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  en células THP-1.

Aunque NFAT tiene una absoluta dependencia por la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ /Cn, lo que le hace muy sensible a los cambios en la concentración y oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Dolmetsch *et al.*, 1998), varios estudios relacionan también a la Cn y al  $\text{Ca}^{2+}$  con la activación de NF- $\kappa$ B (Frantz *et al.*, 1994; Mattila *et al.*, 1990). Estos efectos sobre NF- $\kappa$ B podrían explicar algunos de nuestros resultados respecto a la acción del  $\text{I}\alpha$  sobre la inducción de COX-2. Así, se ha descrito que la Cn mediaría la expresión de iNOS favoreciendo la hiperfosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  por IKK $\beta$  en células RAW 264.7 y macrófagos peritoneales de ratón estimulados con LPS (Kim *et al.*, 2004). Según estos autores, el LPS sería capaz de movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induciendo así la actividad de la Cn, si bien es cierto que nosotros no hemos detectado la capacidad de LPS para movilizar  $\text{Ca}^{2+}$ , existen publicaciones en ambos sentidos (Letari *et al.*, 1991; Raddassi *et al.*, 1994; West *et al.*, 1996). Otra publicación, implica a la Cn también con



NF- $\kappa$ B por una interacción directa con una subunidad del proteosoma, encargada de degradar I $\kappa$ B. En este caso la Cn estimularía la expresión de factores inflamatorios como IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pero no involucran al LPS en la activación de Cn sino a la movilización de Ca<sup>2+</sup> por el Ion (Zhang y Wei, 2011). En base a todo esto, y recordando que se ha descrito que el NF- $\kappa$ B y NFAT responden de diferente manera a la frecuencia de la oscilación de la señal de Ca<sup>2+</sup> (Dolmetsch *et al.*, 1998), podríamos asumir una regulación doble de estos genes por parte de la Cn. De este modo, las frecuencias bajas activarían sólo NF- $\kappa$ B, ya que un breve pico de Ca<sup>2+</sup> mantiene a NF- $\kappa$ B durante más de 16 minutos en el núcleo (Dolmetsch *et al.*, 1997). Y por otro lado, altas frecuencias que permitan una elevación sostenida Ca<sup>2+</sup> intracelular, como las suministradas por ionóforos, activarían la translocación y mantenimiento de NFAT en el núcleo. Este mecanismo ya ha sido descrito en linfocitos B (Scharenberg *et al.*, 2007).

Nuestros resultados muestran una inhibición por CsA en la acción del LPS sobre COX-2 e iNOS y de modo más interesante, observamos una inducción de la actividad transcripcional de NFAT por LPS. Existen publicaciones que relacionan al LPS con la activación de NFAT (Buxadé *et al.*, 2012; Yarilina *et al.*, 2011; Zanoni *et al.*, 2012; Zanoni *et al.*, 2009). En células dendríticas, se ha visto que la activación de TLR4/CD14 por LPS, induce a la familia de quinasas Src y a PLC $\gamma$ 2, también genera una entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular y la translocación de NFAT al núcleo dependiente de Cn aunque es dependiente principalmente de CD14 y no de TLR4 (Zanoni *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha publicado que el NFAT5, que es independiente de elevaciones de Ca<sup>2+</sup>, participa en la expresión de genes inducidos vía TLR en macrófagos y que lo hace de manera independiente a su función osmoreguladora, entre ellos iNOS, TNF, IL-6 y COX-2 (Buxadé *et al.*, 2012). En conclusión, pensamos que LPS/TLR4 induciría NFAT, aunque principalmente mediante la activación por fosforilación inducible del dominio transactivador TAD por las quinasas como Cot o PKC (Gómez-Casero *et al.*, 2007; San-Antonio *et al.*, 2002) que son activadas por LPS/TLR4.

## **6. Regulación de la expresión de COX-2 en respuesta a ligandos de GPCRs acoplados a G $\alpha$ q.**

Aunque preliminares, nuestros resultados sugieren un papel en la fisiología del macrófago y, concretamente, en los efectos mediados por COX-2 de ciertos receptores GPCR, acoplados a proteína G $\alpha$ q, como los receptores de prostanoïdes, y los de angiotensina y endotelina que median su acción vía Ca<sup>2+</sup> intracelular. La interacción de

la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  con su receptor, FP, produce un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Carrasco *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1995), lo que lleva a la activación de NFAT en células de músculo liso y células de cáncer endometrial (Horsley y Pavlath, 2003; Sales *et al.*, 2009). Se ha descrito que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  incrementa la expresión de IL-6 en osteoblastos (Minamitani *et al.*, 2008) o la expresión de COX-2 en células de adenocarcinoma de endometrio (Jabbour *et al.*, 2005). Nosotros hemos descrito por vez primera la presencia de FP en células mieloides y hemos visto que la estimulación de células RAW 264.7 con agonistas del receptor FP, induce la expresión de COX-2 y que además, dicha inducción se ve aumentada cuando se añade LPS, produciéndose un efecto de cooperación similar al observado anteriormente para  $\text{I}\alpha\text{N}+\text{LPS}$ . Mediante transfecciones transitorias empleando el plásmido NFAT-luc, confirmamos que el tratamiento con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  producía un incremento de la actividad luciferasa, y que además, éste era aún mayor estimulando conjuntamente con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y LPS. Aunque mediante *Western Blot* habíamos confirmado la expresión de FP en macrófagos, sólo se detectó este incremento en la actividad luciferasa cuando se co-transfectó con un plásmido para FP, sugiriendo niveles bajos del receptor. Observamos este mismo comportamiento para COX-2 luc. Estos resultados sugieren un posible papel de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre la expresión de COX-2, vía  $\text{Ca}^{2+}/\text{Cn}/\text{NFAT}$  en macrófagos, no descrita hasta la fecha.

También analizamos el efecto de otras dos moléculas que señalizan mediante receptores tipo GPCR acoplados a  $\text{G}\alpha_q$ , y por tanto, mediante  $\text{Ca}^{2+}$  y que están implicadas en patologías cardiovasculares como Ang II y ET-1 pero que apenas existen descripciones sobre su papel en la fisiología de los macrófagos. Ang II no sólo desarrolla funciones fisiológicas como la vasoconstricción y la presión sanguínea, también está implicada en la inflamación, en la disfunción endotelial, la aterosclerosis, la hipertensión y fallos cardíacos (Mehta y Griendling, 2007). Se ha descrito su papel en la inducción de COX-2 en células de endotelio de rata a través de  $\text{Cn}/\text{NFAT}$  (Abraham *et al.*, 2012). La ET-1 es también una molécula con propiedades vasoconstrictoras, que es capaz de aumentar la expresión de COX-2 en varios tipos celulares (Deacon y Knox, 2010; Pratt *et al.*, 2003). También se ha descrito que ET-1 disminuye los niveles del transportador de colesterol, ABCG1, en macrófagos (Lin *et al.*, 2011). Puesto que, en la segunda parte de esta tesis, hemos visto que la deficiencia de COX-2 tiene un efecto opuesto en este transportador, es posible que ET-1 vía la inducción de COX-2 disminuya los niveles de ABCA1. Aunque no realizamos experimentos que probaran directamente la implicación de NFAT en la señalización de la respuesta mediada por estas dos moléculas, sí podemos afirmar que son capaces de inducir la expresión de

COX-2 en macrófagos y basándonos en las similitudes con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  también acoplado a Gαq, la vía  $\text{Ca}^{2+}$ /Cn/NFAT podría jugar un papel importante en esta activación.

En conjunto, nuestros resultados demuestran un papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la fisiología del macrófago, y en la inducción de COX-2 no descrito hasta ahora. Además, existe un cooperación con la señalización a través del TLR4 implicado abundantemente en la patología de muchas enfermedades, incluyendo la aterosclerosis (den Dekker *et al.*, 2010; Moghimpour Bijani *et al.*, 2012). Dado que este ión transduce la señal de múltiples receptores, algunos de ellos como los de Ang II y ET-1, implicados en alteraciones cardiovasculares donde también están involucrados los macrófagos, TLR4 y COX-2, se abre una nueva vía de estudio que relacione a todos ellos en las diferentes patologías cardiovasculares.

## **II. PAPEL DE COX-2 EN LA ATEROSCLEROSIS. IMPACTO DE LA AUSENCIA DE COX-2 EN EL TRANSPORTE DEL COLESTEROL EN MACRÓFAGOS.**

La aterosclerosis, es considerada una enfermedad inflamatoria progresiva y crónica, y es la causa subyacente de la enfermedad coronaria y los accidentes cerebrovasculares. COX-2 y los prostanoïdes derivados de su acción enzimática, pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, controlando la estabilidad de la placa y la inflamación local de la pared vascular (Iñiguez *et al.*, 2008; Linton y Fazio, 2008). Sin embargo, el papel beneficioso o perjudicial de COX-2 es objeto de intenso debate ya que los resultados conseguidos hasta la fecha empleando distintos aproximaciones experimentales son contradictorios. Está establecido que los prostanoïdes juegan un papel importante en la generación del trombo, donde el balance  $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$  es importante. Ello se debe a las propiedades vasodilatadoras de  $\text{PGI}_2$  inhibiendo la agregación plaquetaria, en contraste con  $\text{TXA}_2$  que activa a las plaquetas y presenta propiedades protrombóticas y vasoconstrictoras (Linton y Fazio, 2008). Tras detectarse que la utilización crónica de inhibidores selectivos de COX-2, coxibs, aumentan el riesgo de padecer eventos cardiovasculares, en otras patologías, se ha ido consolidando como explicación de este efecto su capacidad de inhibir la producción de  $\text{PGI}_2$  por células endoteliales y macrófagos, mientras que la producción de  $\text{TXA}_2$  no se ve alterada, incrementando así el riesgo de aterotrombosis (FitzGerald, 2004; Gabrielsen *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2009). Esto sugiere un papel anti-aterogénico a la COX-2. Sin embargo, los resultados en modelos de ratón son más dispares indicando que la inhibición de COX-2 puede acelerar, reducir o no tener impacto alguno en la

progresión de la enfermedad (Bea *et al.*, 2003; Burleigh *et al.*, 2005; Metzner *et al.*, 2007; Narasimha *et al.*, 2007; Rott *et al.*, 2003).

### 3. Desarrollo de aterosclerosis en ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*.

Todas las aproximaciones realizadas hasta la fecha para estudiar el papel de COX-2 en aterosclerosis, se han basado principalmente en la administración de inhibidores específicos de COX-2 en modelos de ratón *ApoE<sup>-/-</sup>* o *Ldlr<sup>-/-</sup>* (Bea *et al.*, 2003; Burleigh *et al.*, 2005; Olesen *et al.*, 2002), en el uso de ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>* (Narasimha *et al.*, 2007), en la eliminación selectiva de COX-2 en diferentes linajes mieloides de ratón (Hui *et al.*, 2010; Narasimha *et al.*, 2010) o en experimentos de trasplante de células (Burleigh *et al.*, 2002). Ninguno de ellos había estudiado la eliminación completa de COX-2 en un modelo de ratón aterosclerótico exceptuando el reciente de Yu *et al.* donde inducían la eliminación genética de COX-2 de manera postnatal, en ratones *ApoE<sup>-/-</sup>* (Yu *et al.*, 2012). Ello probablemente se debe a que los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>* presentan problemas a nivel renal (Dinchuk *et al.*, 1995; Morham *et al.*, 1995), y por tanto, la administración de una dieta aterogénica puede conducirles incluso a la muerte. Sin embargo, recientes estudios han identificado al colato, y no a la dieta en sí, como el principal causante de la muerte prematura de los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>* en una dieta aterogénica (Lin *et al.*, 2007). Por ello, en la composición de la dieta empleada para nuestros estudios no se encuentra este suplemento, habitual en este tipo de dietas, lo que puede explicar que no se dieran muertes prematuras y pudiéramos llevar a cabo los experimentos.

Los resultados obtenidos en esta tesis empleando un modelo *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* generado en nuestro laboratorio, nos mostraron una disminución de las lesiones respecto a los *Cox-2<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, menor complejidad de la composición de las mismas y un mejor perfil lipídico sistémico. Nuestros resultados, otorgan pues un papel proaterogénico a COX-2 y coinciden con algunas publicaciones anteriores que describen una lesión menor en presencia de inhibidores de COX-2 o en animales con Cox-2 eliminado genéticamente en algunos tipos celulares principalmente macrófagos (Burleigh *et al.*, 2002; Burleigh *et al.*, 2005; Hui *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2008; Metzner *et al.*, 2007). Sin embargo, independientemente de la conclusión obtenida en los diferentes modelos animales, tanto los que confieren un papel proaterogénico como los que apuntan a una acción anti-aterogénica de COX-2 en la enfermedad, basan su razonamiento principalmente en alteraciones en la relación PGI/TXA<sub>2</sub> o en la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de los macrófagos. Nosotros, hemos visto por primera vez que COX-

2, además, puede jugar un papel en el control del flujo del colesterol y que podría explicar este papel pro-aterogénico de COX-2 que hemos identificado y que se discutirá más adelante.

Recientemente, *Yu et al.* mediante un modelo de ratón *Apoe<sup>-/-</sup>* donde inducían la eliminación genética de COX-2 de manera postnatal, describieron un aumento de las lesiones ateromatosas en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>* y las atribuyen a un incremento de leucotrienos en ausencia de COX-2, ya que estos desaparecían mediante la eliminación de la proteína FLAP implicada en su síntesis, aunque no muestran datos sobre balance  $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ , ampliamente publicitado por este grupo como el único causante de la alteraciones cardiovasculares de los coxibs (*Yu et al.*, 2012). Estos resultados, que sugieren un papel anti-aterogénico de COX-2, están en aparente contradicción con los descritos en esta tesis. Ello puede deberse a varias causas: a) en su caso mantuvieron a los ratones bajo dieta aterogénica durante 4 meses, el doble de tiempo que nosotros, por lo que no podemos descartar que en fases más avanzadas la inhibición de COX-2 sea contraproducente; b) la inducción de la eliminación génica postnatal a veces no es tan completa como la llevada a cabo de modo permanente, aunque en sus resultados la eliminación parece muy eficiente; c) el efecto de la delección permanente de COX-2 puede dar lugar a compensaciones por COX-1 no generadas en los mutantes condicionales.

Por otra parte el mismo grupo, ha sugerido un papel opuesto, anti-aterogénico de COX-2 en macrófagos, usando un sistema de eliminación selectiva de COX-2 en estas células (*Hui et al.*, 2010), aunque esto no ha sido reproducido por otro grupo usando una estrategia similar (*Narasimha et al.*, 2010). Por otro lado, se sabe que durante la fase temprana del desarrollo de la aterosclerosis, se produce una respuesta inflamatoria inicial en la que los macrófagos y las células endoteliales, sobreexpresan COX-2, lo que provoca un aumento en la producción de  $\text{PGE}_2$  y la activación de la migración de células inmunes a la pared vascular, la propagación de la cascada de citoquinas proinflamatorias y la activación de la quimiotaxis (*Baker et al.*, 1999; *Burleigh et al.*, 2002; *Schönbeck et al.*, 1999; *Vane et al.*, 1998). Así, es concebible que en esta fase de la enfermedad, COX-2 tenga un papel eminentemente pro-aterogénico. Esto encaja con nuestros resultados en ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/Apoe<sup>-/-</sup>*, que además de tener menos lesión, presentan una menor inducción de marcadores de células inmunes como CD4, CD8 y CD11c, y una disminución en los niveles de IL-6 y TNF, o la quimioquina MCP-1 en aorta. Aunque estos datos no parecen trasladarse a nivel sistémico o en otros órganos linfoides secundarios como bazo, que suele ser un reflejo de la inmunidad sistémica,

donde no parecen existir alteraciones significativas ni en las poblaciones inmunes ni de citoquinas. Tampoco se aprecian diferencias relevantes en los valores circulantes de citoquinas en suero, excepto para algunas y en algunos tiempos aislados, ya que los perfiles de inducción de dichas citoquinas tras la dieta grasa fueron diferentes. Así, hay un cierto incremento de citoquinas inflamatorias en suero como IL-17 e IL-6 pero muy variable, siendo mayor tras 5 semanas de dieta, pero no tras 10 semanas, que es cuando podrían ser comparables a los valores obtenidos en los bazo. Estas dos citoquinas parecen estar elevadas en los ratones deficientes de COX-2. Por el contrario, la quimioquina MCP-1 está disminuida en ausencia de COX-2 especialmente en el tiempo de dieta más largo. Esta citoquina es muy importante para la migración de los macrófagos a la placa de ateroma (Kanzler *et al.*, 2012) y los menores niveles séricos, y en aorta podrían explicar la menor infiltración mieloide en dicha lesión. En este sentido los animales *Cox-2<sup>-/-</sup>* tienen menos infiltración de macrófagos en todos los modelos que se han estudiado en nuestro laboratorio (Néstor Guerrero, tesis doctoral; Díaz-Muñoz *et al.*, 2013).

Por otro lado, ya hemos mencionado que los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>* tienen problemas a nivel renal y además, se ha publicado que en dietas que contienen colato pueden desarrollar inflamación intestinal similar a la enfermedad de Cron (Lin *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2010). Así, aunque a nivel macroscópico no vimos diferencias entre los ratones dobles *knock out* y los control, no estudiamos la función renal, ni analizamos el posible desarrollo de otras patologías que potencialmente pudieran darse en los *Cox-2<sup>-/-</sup>* /*Apoe<sup>-/-</sup>*, y pudieran influir en los valores inmunes sistémicos. Además, aunque las citoquinas juegan un papel clave durante la inflamación crónica, la regulación de su producción a nivel sistémico depende de muchos factores (Tedgui y Mallat, 2006). En cualquier caso, creemos que resultan más relevantes los valores locales obtenidos en aorta, y no pensamos que los niveles circulantes de citoquinas estén afectando significativamente la evolución de la aterosclerosis en nuestro modelo.

La composición de la placa en el modelo *apoE<sup>-/-</sup>* es importante puesto que va adquiriendo más complejidad con el avance de la enfermedad (Nakashima *et al.*, 1994). De modo que en etapas iniciales, encontraremos mayoritariamente células espumosas y posteriormente, podremos encontrar desde células musculares migrando hasta cápsulas fibrosas e incluso núcleos necróticos. Aunque no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos de animales, la cuantificación de las tinciones realizadas muestra una tendencia a que las lesiones de los ratones *COX-2<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>* sean menos complejas,

especialmente porque hay un menor número de células musculares que han migrado a la íntima

Por último, cabe recordar que los experimentos utilizando coxibs en humanos y ratón presentan una diferencia fundamental. En los primeros el coxib se da en pacientes que podrían ya tener una lesión ateromatosa incipiente, dada su edad e inflamación crónica, mientras que en los modelos de ratón los compuestos se suministran normalmente al inicio del experimento. Ello podría explicar el porqué en estos últimos casos se observa un efecto generalmente beneficioso de los coxibs en contraste con los datos perjudiciales en humanos y apoyaría nuestra hipótesis de un efecto beneficioso preventivo de la inhibición de COX-2 en las etapas tempranas de la enfermedad.

#### **4. Efecto de COX-2 en la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol en macrófagos.**

A diferencia de estudios anteriores donde no se observaron diferencias significativas en los niveles totales de colesterol y triglicéridos en diferentes modelos de inhibición de COX-2, bien en diferentes tipos celulares o tras eliminación génica inducible postnatalmente (Burleigh et al., 2005; Narasimha et al., 2007; Yu et al., 2012), nuestros resultados muestran un descenso en los niveles de triglicéridos y colesterol total en los ratones *Cox-2<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>*, así como un incremento en la concentración de colesterol HDL. Los niveles de lípidos circulantes son cruciales en la aterosclerosis siendo la elevación de los niveles de colesterol el principal desencadenante de la enfermedad. En la clínica, valores altos de triglicéridos y colesterol total, especialmente el LDL/VLDL, se consideran valores de riesgo y están relacionados con enfermedades cardiovasculares. Una excepción es la fracción HDL, que ejerce una acción protectora (Navab et al., 1996; Tall et al., 2008), por lo que nuestros resultados sobre HDL y triglicéridos podrían explicar por sí mismos la menor extensión de la lesión en estos animales. En la actualidad existen varias terapias potenciales contra la aterosclerosis diseñadas exclusivamente para elevar los niveles de HDL (Brewer, 2007; Navab et al., 2011).

Estos resultados nos llevaron a analizar más en detalle el transporte de colesterol en macrófagos y la expresión de ARNm de genes relacionados con el transporte de colesterol. En los últimos años, se ha empezado a demostrar la importancia de los estudios de flujo de colesterol en la aterosclerosis (Marcel et al.,



2008; Ye et al., 2010; Zanotti et al., 2011). Está descrito que CD36 y SR-A participan en el proceso de captación de oxLDL y acLDL, mientras que LDLr captaría LDLs poco modificadas (Glass y Witztum, 2001; Kunjathoor *et al.*, 2002; Mäkinen *et al.*, 2010). ABCA1, ABCG1 y apoE, median la salida de colesterol en forma de HDL, participando activamente en el transporte reverso del colesterol (Oram y Vaughan, 2006; Zhao *et al.*, 2011). Y por último PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  se describen como moléculas antiinflamatorias y participan en la regulación de genes como ABCA1 y ABCG1 (Costet *et al.*, 2000; Chawla *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004). Estudiando este proceso en el modelo *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup>, encontramos que todos estos genes, excepto el LDLr que no presenta diferencias, se encontraban disminuidos en aorta. Esto tiene sentido puesto que el LDLr participa en la captación de LDLs poco modificadas, menos abundantes en el proceso ateroesclerótico (Navab *et al.*, 1996). Si bien no encontramos diferencias en la formación de células espumosas, observamos una menor captación de acLDL en macrófagos peritoneales de estos animales, y un mayor porcentaje de flujo de colesterol hacia partículas ApoA-I y HDL. La disminución de estos transportadores en aorta de *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup>, podría simplemente deberse a una menor infiltración en la aorta de células mieloides observada en estos ratones.

Puesto que hasta la fecha no se habían descrito diferencias en la concentración de colesterol y triglicéridos en animales deficientes para COX-2, estos procesos no han sido muy estudiados. Publicaciones del grupo de la doctora A.B Reiss, describen un aumento en la formación de células espumosas en ausencia de COX-2 (Anwar *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2007). Sin embargo, todos sus estudios están realizados *in vitro* empleando inhibidores de COX-2 en la línea celular THP-1, por lo que sus resultados son difícilmente comparables con los nuestros.

Analizando estos mismos genes en macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>, o en células RAW 264.7 y macrófagos peritoneales de ratones *Cox-2*<sup>+/+</sup> a los que se añadieron inhibidores de COX-2, encontramos algunas diferencias en el comportamiento de estas tres aproximaciones. Por ejemplo, en el caso de CD36 y SR-A, vimos que mientras en los macrófagos *Cox-2*<sup>-/-</sup> no variaban o tendían a disminuir, en células donde se empleó celecoxib aumentaban ligeramente, lo que podría explicar parte de los resultados de la doctora A.B Reiss. Sin embargo, la eliminación de COX-2 produce por lo general un aumento de los genes relacionados con la salida de colesterol, ABCA1, ABCG1 así como de PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$ . Es muy probable que todo ello esté relacionado pues PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$  inducen la transcripción de ABCA1 y ABCG1 (Costet *et al.*, 2000; Chawla *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004). Además se ha descrito que la



CsA inhibe la secreción de apoE en macrófagos (Kockx *et al.*, 2009). Es posible que este efecto estuviese mediado por COX-2 ya que hemos demostrado que CsA inhibe su inducción y que los macrófagos sin COX-2 tienen elevados niveles de apoE. La importancia de los transportadores, como ABCA1, en macrófagos para el desarrollo de la aterosclerosis se ha visto refrendada recientemente, ya que la inactivación de este gen en macrófagos protege del desarrollo de la enfermedad en animales *Apoe*<sup>-/-</sup> (Francone *et al.*, 2005).

Nuestros datos sobre el incremento de transportadores, fueron confirmados por los experimentos funcionales de flujo de colesterol en macrófagos de ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>. Por último, destacamos también que la adición de PGE<sub>2</sub> en macrófagos *Cox-2*<sup>-/-</sup>, produce una disminución en el incremento de la expresión de ARNm de genes como ABCG1, PPAR $\gamma$  y LXR $\alpha$ . Nuestros resultados demuestran que los macrófagos deficientes en COX-2 tienen incrementados los genes y la capacidad de transporte reverso de colesterol. Ello unido a una menor presencia de estas células en la placa de ateroma, debido a una menor migración, conjuntamente con un aumento en genes antiinflamatorios como PPAR $\gamma$ , todo ello redundaría en una placa ateromatosa menos inflamada y con menos lesión, que es lo que observamos experimentalmente. Nuestros resultados demuestran un papel de COX-2 en el flujo del colesterol, lo que abre nuevas vías en el estudio del papel de las PGs en este proceso determinante para el desarrollo de la aterosclerosis.

En conclusión, aunque no podemos descartar que la inhibición de COX-2 acabe provocando un aumento en el riesgo de aterotrombosis, como así sugieren los estudios con inhibidores selectivos, nuestros resultados apoyan la teoría de que su inhibición en las fases iniciales de esta enfermedad sería beneficiosa al disminuir la respuesta inflamatoria y el reclutamiento de células inmunes en la íntima. Además, su inhibición puede aumentar los valores de HDL, el transporte reverso del colesterol en macrófagos, e incluso mantenerlos en un estado “M2-Like” y que todo ello tendría un valor preventivo de la aterosclerosis.

## CONCLUSIONES



- 1- La elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tras el tratamiento con ionóforos induce la expresión de COX-2 y la producción de  $\text{PGE}_2$  en macrófagos.
- 2- Ligandos de GPCRs acoplados a  $G_{\alpha q}$  como  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , Ang II y End I, que promueven un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, inducen la expresión de COX-2 en macrófagos.
- 3- En la inducción de COX-2 mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  en macrófagos desempeña un papel esencial la activación de la vía de señalización de calcineurina/NFAT.
- 4- La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y la mediada por LPS presentan un efecto cooperativo en la inducción de COX-2, con la activación de los factores de transcripción NFAT y NF- $\kappa$ B
- 5- La deficiencia en COX-2 en ratones *Apoe*<sup>-/-</sup> alimentados con dieta hipercolesterolémica conduce a una reducción en la formación de las placas de ateroma, con menor presencia de leucocitos infiltrantes en la íntima y una disminución en la expresión de genes inflamatorios en la aorta.
- 6- Los ratones *Apoe*<sup>-/-</sup>/*Cox-2*<sup>-/-</sup> sometidos a dieta hipercolesterolémica presentan unos niveles séricos de colesterol y triglicéridos menores que los ratones *Cox-2*<sup>-/-</sup>/*Apoe*<sup>-/-</sup> con un incremento en los niveles de HDLs.
- 7- En los macrófagos *Cox-2*<sup>-/-</sup> se observa una disminución de la captación de acLDLs y un incremento en el flujo de salida de colesterol.
- 8- La deficiencia en COX-2 en macrófagos *Cox-2*<sup>-/-</sup> produce una alteración de la expresión de genes relacionados con la captación y transporte de colesterol que no se reproduce con la inhibición de la actividad enzimática de la COX-2 con celecoxib.
- 9- En conjunto, los resultados obtenidos indicarían que la deficiencia de COX-2 tendría un papel anti-aterogénico.

## **BIBLIOGRAFÍA**



**Abraham, F., Sacerdoti, F., De León, R., Gentile, T., y Canellada, A. (2012).** Angiotensin II Activates the Calcineurin/NFAT Signaling Pathway and Induces Cyclooxygenase-2 Expression in Rat Endometrial Stromal Cells. *PLoS ONE* 7, e37750.

**Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T.H., Bayne, M.A., Metters, K.M., Slipetz, D.M., y Grygorczyk, R. (1994).** Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269, 2632-2636.

**Alfranca, A., Iñiguez, M.A., Fresno, M., y Redondo, J.M. (2006).** Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 70, 446-456.

**Alves, C.F., de Melo, N.F.S., Fraceto, L.F., de Araújo, D.R., y Napimoga, M.H. (2011).** Effects of 15d-PGJ2-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *British Journal of Pharmacology* 162, 623-632.

**An, H., Yu, Y., Zhang, M., Xu, H., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Guo, J., et al. (2002).** Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 106, 38-45.

**Andrés, V., Pello, O.M., y Silvestre-Roig, C. (2012).** Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 23, 429-438 410.1097/MOL.1090b1013e328357a328379.

**Anwar, K., Voloshyna, I., Littlefield, M., Carsons, S., Wirkowski, P., Jaber, N., Sohn, A., Eapen, S., y Reiss, A. (2011).** COX-2 Inhibition and Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 Increase CD36 Expression and Foam Cell Formation in THP-1 Cells. *Lipids* 46, 131-142.

**Aoki, T., y Narumiya, S. (2012).** Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 304-311.

**Ardans, J.A., Economou, A.P., Martinson, J.M., Zhou, M., y Wahl, L.M. (2002).** Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 71, 1012-1018.

**Baba, Y., y Kurosaki, T. (2011).** Impact of Ca<sup>2+</sup> signaling on B cell function. *Trends in immunology* 32, 589-594.

**Babaev, V.R., Gleaves, L.A., Carter, K.J., Suzuki, H., Kodama, T., Fazio, S., y Linton, M.F. (2000).** Reduced Atherosclerotic Lesions in Mice Deficient for Total or Macrophage-Specific Expression of Scavenger Receptor-A. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20, 2593-2599.

**Baker, C.S.R., Hall, R.J.C., Evans, T.J., Pomerance, A., MacLough, J., Creminon, C., Yacoub, M.H., y Polak, J.M. (1999).** Cyclooxygenase-2 Is Widely Expressed in Atherosclerotic Lesions Affecting Native and Transplanted Human Coronary Arteries and Colocalizes With Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Particularly in Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 646-655.

**Basu, S. (2007).** Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2alpha from physiology to new principles in inflammation. *Med Res Rev* 27, 435-468.

**Basu, S. (2010).** Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) and F(2)-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells* 30, 383-391.

**Bea, F., Blessing, E., Bennett, B.J., Kuo, C.C., Campbell, L.A., Kreuzer, J., y Rosenfeld, M.E. (2003).** Chronic inhibition of cyclooxygenase-2 does not alter plaque composition in a mouse model of advanced unstable atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 60, 198-204.

**Belton, O.A., Duffy, A., Toomey, S., y Fitzgerald, D.J. (2003).** Cyclooxygenase Isoforms and Platelet Vessel Wall Interactions in the Apolipoprotein E Knockout Mouse Model of Atherosclerosis. *Circulation* 108, 3017-3023.

**Berridge, M.J., Bootman, M.D., y Lipp, P. (1998).** Calcium - a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.

**Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M.B., Hawkey, C.J., Hochberg, M.C., et al. (2000).** Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 343, 1520-1528.

**Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., y Charo, I.F. (1998).** Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897.

**Boyle, J.J. (2005).** Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 3, 63-68.

**Bresalier, R.S., Sandler, R.S., Quan, H., Bolognese, J.A., Oxenius, B., Horgan, K., Lines, C., Riddell, R., Morton, D., Lanas, A., et al. (2005).** Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial. *New England Journal of Medicine* 352, 1092-1102.

**Brewer, H.B., Jr. (2007).** HDL metabolism and the role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep* 9, 486-492.

**Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., y Breyer, M.D. (2001).** PROSTANOID RECEPTORS: Subtypes and Signaling 1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 661-690.

**Brown, D.M., Donaldson, K., Borm, P.J., Schins, R.P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L.A., y Stone, V. (2004).** Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- $\alpha$  cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 286, L344-L353.

**Buchmüller-Rouiller, Y., y Mauël, J. (1991).** Macrophage activation for intracellular killing as induced by calcium ionophore. Correlation with biologic and biochemical events. *The Journal of Immunology* 146, 217-223.

**Bujold, K., Rhainds, D., Jossart, C., Febbraio, M., Marleau, S., y Ong, H. (2009).** CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPAR $\gamma$  activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovascular Research* 83, 457-464.

**Burleigh, M.E., Babaev, V.R., Oates, J.A., Harris, R.C., Gautam, S., Riendeau, D., Marnett, L.J., Morrow, J.D., Fazio, S., y Linton, M.F. (2002).** Cyclooxygenase-2 Promotes Early Atherosclerotic Lesion Formation in LDL Receptor-Deficient Mice. *Circulation* 105, 1816-1823.

**Burleigh, M.E., Babaev, V.R., Yancey, P.G., Major, A.S., McCaleb, J.L., Oates, J.A., Morrow, J.D., Fazio, S., y Linton, M.F. (2005).** Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39, 443-452.

**Buxadé, M., Lunazzi, G., Minguillón, J., Iborra, S., Berga-Bolaños, R., del Val, M., Aramburu, J., y López-Rodríguez, C. (2012).** Gene expression induced by Toll-like receptors in macrophages requires the transcription factor NFAT5. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 379-393.

**Carrasco, M.P., Phaneuf, S., Asbóth, G., y López Bernal, A. (1996).** Fluprostenol activates phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> mobilization in human myometrial cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 81, 2104-2110.

**Cassetta, L., Cassol, E., y Poli, G. (2011).** Macrophage Polarization in Health and Disease. *TheScientificWorldJOURNAL* 11, 12.

**Catley, M.C., Chivers, J.E., Cambridge, L.M., Holden, N., Slater, D.M., Staples, K.J., Bergmann, M.W., Loser, P., Barnes, P.J., y Newton, R. (2003).** IL-1 $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B mediates PGE<sub>2</sub> release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Letters* 547, 75-79.

**Chan, E., Zhang, H., Fernandez, P., Edelman, S., Pillinger, M., Ragolia, L., Palaia, T., Carsons, S., y Reiss, A. (2007).** Effect of cyclooxygenase inhibition on cholesterol efflux proteins and atheromatous foam cell transformation in THP-1 human macrophages: a possible mechanism for increased cardiovascular risk. *Arthritis Research & Therapy* 9, R4.

**Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.-H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., et al. (2001).** A PPAR $\gamma$ -LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages Is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis. *Molecular cell* 7, 161-171.

**Chen, Y.J., y Lin-Shiau, S.Y. (2000).** The role of endoplasmic reticular Ca(2+) stores in cell viability and tumor necrosis factor- $\alpha$  production of the murine macrophage RAW 264.7 cell line. *J Biomed Sci* 7, 122-127.

**Cipollone, F., Fazio, M., Iezzi, A., Ciabattini, G., Pini, B., Cuccurullo, C., Uchino, S., Spigonardo, F., De Luca, M., Prontera, C., et al. (2004).** Balance Between PGD Synthase and PGE Synthase Is a Major Determinant of Atherosclerotic Plaque Instability in Humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 1259-1265.

**Cipollone, F., Fazio, M.L., Iezzi, A., Cuccurullo, C., De Cesare, D., Uchino, S., Spigonardo, F., Marchetti, A., Buttitta, F., Paloscia, L., et al. (2005).** Association Between Prostaglandin E Receptor Subtype EP4 Overexpression and Unstable Phenotype in Atherosclerotic Plaques in Human. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 1925-1931.

**Conboy, I.M., Manoli, D., Mhaikar, V., y Jones, P.P. (1999).** Calcineurin and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase modulate macrophage effector functions, pp. 6324-6329.

**Costet, P., Luo, Y., Wang, N., y Tall, A.R. (2000).** Sterol-dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28240-28245.

**Crabtree, G.R. (2001).** Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2313-2316.

**Crabtree, G.R., y Olson, E.N. (2002).** NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells. *Cell* 109, S67-S79.

**Crofford, L.J., Wilder, R.L., Ristim, xE, ki, A.P., Sano, H., Remmers, E.F., Epps, H.R., y Hla, T. (1994).** Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *The Journal of Clinical Investigation* 93, 1095-1101.

**Cybulsky, M.I., y Gimbrone, M.A., Jr. (1991).** Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251, 788-791.

**Daugherty, A., y Whitman, S.C. (2003).** Quantification of atherosclerosis in mice. *Methods Mol Biol* 209, 293-309.

**de Gregorio, R., Iñiguez, M.A., Fresno, M., y Alemany, S. (2001).** Cot Kinase Induces Cyclooxygenase-2 Expression in T Cells through Activation of the Nuclear Factor of Activated T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 27003-27009.

**Deacon, K., y Knox, A.J. (2010).** Endothelin-1 (ET-1) Increases the Expression of Remodeling Genes in Vascular Smooth Muscle through Linked Calcium and cAMP Pathways: ROLE OF A PHOSPHOLIPASE A2(cPLA2)/CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2)/PROSTACYCLIN RECEPTOR-DEPENDENT AUTOCRINE LOOP. *Journal of Biological Chemistry* 285, 25913-25927.

**Dedkova EN, S.A., Zinchenko VP. (2000).** Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: ionophore-resistant cells. *Membr Cell Biol*.

**del Arco, P.G., Martínez-Martínez, S., Maldonado, J.L., Ortega-Pérez, I., y Redondo, J.M. (2000).** A Role for the p38 MAP Kinase Pathway in the Nuclear Shuttling of NFATp. *Journal of Biological Chemistry* 275, 13872-13878.

**Del Corno, M., Liu, Q.-H., Schols, D., de Clercq, E., Gessani, S., Freedman, B.D., y Collman, R.G. (2001).** HIV-1 gp120 and chemokine activation of Pyk2 and mitogen-activated protein kinases in primary macrophages mediated by calcium-dependent, pertussis toxin-insensitive chemokine receptor signaling. *Blood* 98, 2909-2916.

**den Dekker, W.K., Cheng, C., Pasterkamp, G., y Duckers, H.J. (2010).** Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis* 209, 314-320.

**Díaz-Muñoz, M.D., Osma-García, I.C., Cacheiro-Llaguno, C., Fresno, M., y Iñiguez, M.A. (2010).** Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cellular Signalling* 22, 1427-1436.

**Díaz-Muñoz, M.D., Osma-García, I.C., Iñiguez, M.A., y Fresno, M. (2013).** Cyclooxygenase-2 Deficiency in Macrophages Leads to Defective p110γ PI3K Signaling and Impairs Cell Adhesion and Migration. *The Journal of Immunology*.



**Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M., et al. (1995).** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378, 406-409.

**Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., y Healy, J.I. (1997).** Differential activation of transcription factors induced by  $Ca^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.

**Dolmetsch, R.E., Xu, K., y Lewis, R.S. (1998).** Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.

**Doyle, S.L., y O'Neill, L.A.J. (2006).** Toll-like receptors: From the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology* 72, 1102-1113.

**Drysdale, B.E., Yapundich, R.A., Shin, M.L., y Shin, H.S. (1987).** Lipopolysaccharide-mediated macrophage activation: the role of calcium in the generation of tumoricidal activity. *The Journal of Immunology* 138, 951-956.

**Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., A. Van De Putte, L.B., y Lipsky, P.E. (1998).** Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* 12, 1063-1073.

**Duque, J., Díaz-Muñoz, M.D., Fresno, M., y Iñiguez, M.A. (2006).** Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 $\beta$  in colon carcinoma cells. *Cellular Signalling* 18, 1262-1269.

**Duque, J., Fresno, M., y Iñiguez, M.A. (2005).** Expression and Function of the Nuclear Factor of Activated T Cells in Colon Carcinoma Cells: INVOLVEMENT IN THE REGULATION OF CYCLOOXYGENASE-2. *Journal of Biological Chemistry* 280, 8686-8693.

**Durand, D.B., Shaw, J.P., Bush, M.R., Replogle, R.E., Belagaje, R., y Crabtree, G.R. (1988).** Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Molecular and Cellular Biology* 8, 1715-1724.

**Elloumi, H.Z., Maharshak, N., Rao, K.N., Kobayashi, T., Ryu, H.S., Mühlbauer, M., Li, F., Jobin, C., y Plevy, S.E. (2012).** A Cell Permeable Peptide Inhibitor of NFAT Inhibits Macrophage Cytokine Expression and Ameliorates Experimental Colitis. *PLoS ONE* 7, e34172.

**Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., y Protter, A.A. (1993).** CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 268, 11811-11816.

**Erdahl, W.L., Chapman, C.J., Taylor, R.W., y Pfeiffer, D.R. (1994).**  $Ca^{2+}$  transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophysical journal* 66, 1678-1693.

**Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., y Silverstein, R.L. (2000).** Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 105, 1049-1056.

**Feske, S. (2007).** Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7, 690-702.

**FitzGerald, G.A. (2004).** Coxibs and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 351, 1709-1711.

**Fitzgerald, M.L., Mujawar, Z., y Tamehiro, N. (2010).** ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis* 211, 361-370.

**Floto, R.A., Mahaut-Smith, M.P., Allen, J.M., y Somasundaram, B. (1996).** Differentiation of the human monocytic cell line U937 results in an upregulation of the calcium release-activated current, ICRA. *The Journal of Physiology* 495, 331-338.

**Francone, O.L., Royer, L., Boucher, G., Haghpassand, M., Freeman, A., Brees, D., y Aiello, R.J. (2005).** Increased Cholesterol Deposition, Expression of Scavenger Receptors, and Response to Chemotactic Factors in Abca1-Deficient Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 1198-1205.

**Frantz, B., Nordby, E.C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C.V., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., O'Keefe, S.J., y O'Neill, E.A. (1994).** Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *Embo J* 13, 861-870.

**Fric, J., Zelante, T., Wong, A.Y.W., Mertes, A., Yu, H.-B., y Ricciardi-Castagnoli, P. (2012).** NFAT control of innate immunity. *Blood* 120, 1380-1389.

**Funk, C.D., y FitzGerald, G.A. (2007).** COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 470-479.

**Fuster, J.J., Castillo, A.I., Zaragoza, C., Ibáñez, B., y Andrés, V. (2012).** Chapter 1 - Animal Models of Atherosclerosis. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, P.M. Conn, ed. (Academic Press), pp. 1-23.

**Gabrielsen, A., Qiu, H., Bäck, M., Hamberg, M., Hemdahl, A.-L., Agardh, H., Folkersen, L., Swedenborg, J., Hedin, U., Paulsson-Berne, G., et al. (2010).** Thromboxane synthase expression and thromboxane A2 production in the atherosclerotic lesion. *Journal of Molecular Medicine* 88, 795-806.

**Galkina, E., y Ley, K. (2009).** Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis\*. *Annual Review of Immunology* 27, 165-197.

**Gether, U., y Kobilka, B.K. (1998).** G Protein-coupled Receptors: II. MECHANISM OF AGONIST ACTIVATION. *Journal of Biological Chemistry* 273, 17979-17982.

**Gilbert, T., Leclerc, C., y Moreau, M. (2011).** Control of kidney development by calcium ions. *Biochimie* 93, 2126-2131.

**Glass, C.K., y Witztum, J.L. (2001).** Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* 104, 503-516.

**Goldstein, L.J., y Brown, S.M. (1977).** The Low-Density Lipoprotein Pathway and its Relation to Atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry* 46, 897-930.

**Gómez-Casero, E., San-Antonio, B., Iñiguez, M.A., y Fresno, M. (2007).** Cot/Tpl2 and PKC $\zeta$  cooperate in the regulation of the transcriptional activity of NFATc2 through the phosphorylation of its amino-terminal domain. *Cellular Signalling* 19, 1652-1661.

**Goodridge, H.S., Simmons, R.M., y Underhill, D.M. (2007).** Dectin-1 Stimulation by *Candida albicans* Yeast or Zymosan Triggers NFAT Activation in Macrophages and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 178, 3107-3115.

**Greenblatt, M.B., Aliprantis, A., Hu, B., y Glimcher, L.H. (2010).** Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 923-931.

**Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., y Rollins, B.J. (1998).** Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor Deficient Mice. *Molecular cell* 2, 275-281.

**Hämäläinen, M., Lahti, A., y Moilanen, E. (2002).** Calcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. *European Journal of Pharmacology* 448, 239-244.

**Hansson, G.K., Robertson, A.-K.L., y Söderberg-Nauclér, C. (2006).** INFLAMMATION AND ATHEROSCLEROSIS. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1, 297-329.

**Haskó, G., Szabó, C., Németh, Z.H., Lendvai, B., y Vizi, E.S. (1998).** Modulation by dantrolene of endotoxin-induced interleukin-10, tumour necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in vivo and in vitro. *British Journal of Pharmacology* 124, 1099-1106.

**Hayden, M.S., y Ghosh, S. (2011).** NF- $\kappa$ B in immunobiology. *Cell Res* 21, 223-244.

**Hayden, M.S., y Ghosh, S. (2012).** NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Development* 26, 203-234.

**Hegyi, L., Hardwick, S.J., Siow, R.C., y Skepper, J.N. (2001).** Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 27-42.

**Hernández, G.L., Volpert, O.V., Iñiguez, M.A., Lorenzo, E., Martínez-Martínez, S., Grau, R., Fresno, M., y Redondo, J.M. (2001).** Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis by Cyclosporin a: Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 607-620.

**Hoeflich, K.P., y Ikura, M. (2002).** Calmodulin in Action: Diversity in Target Recognition and Activation Mechanisms. *Cell* 108, 739-742.

**Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., y Rao, A. (2003).** Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development* 17, 2205-2232.

**Horsley, V., y Pavlath, G.K. (2002).** Nfat: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *The Journal of Cell Biology* 156, 771-774.

**Horsley, V., y Pavlath, G.K. (2003).** Prostaglandin F2 $\alpha$  stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *The Journal of Cell Biology* 161, 111-118.

**Hotchkiss, R.S., Osborne, D.F., Lappas, G.D., y Karl, I.E. (1995).** Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , and interleukin-1  $\alpha$  in a mouse model of endotoxin. *Shock* 3, 337-342.

**Huang, Z.-F., Massey, J.B., y Via, D.P. (2000).** Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochemical Pharmacology* 59, 187-194.

**Hubbard, K.B., y Hepler, J.R. (2006).** Cell signalling diversity of the Gq $\alpha$  family of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling* 18, 135-150.

**Hui, Y., Ricciotti, E., Crichton, I., Yu, Z., Wang, D., Stubbe, J., Wang, M., Pure, E., y FitzGerald, G.A. (2010).** Targeted deletions of cyclooxygenase-2 and atherogenesis in mice. *Circulation* 121, 2654-2660.

**Iniguez, M.A., Martinez-Martinez, S., Punzon, C., Redondo, J.M., y Fresno, M. (2000).** An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275, 23627-23635.

**Inoue, H., Taba, Y., Miwa, Y., Yokota, C., Miyagi, M., y Sasaguri, T. (2002).** Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Fluid Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 1415-1420.

**Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y., y Tanabe, T. (1995).** Transcriptional Regulation of Human Prostaglandin-endoperoxide Synthase-2 Gene by Lipopolysaccharide and Phorbol Ester in Vascular Endothelial Cells: INVOLVEMENT OF BOTH NUCLEAR FACTOR FOR INTERLEUKIN-6 EXPRESSION SITE AND cAMP RESPONSE ELEMENT. *Journal of Biological Chemistry* 270, 24965-24971.

**Iñiguez, M.A., Cacheiro-Llaguno, C., Cuesta, N., Díaz-Muñoz, M.D., y Fresno, M. (2008).** Prostanoid function and cardiovascular disease. *Archives Of Physiology And Biochemistry* 114, 201-209.

**Iñiguez, M.A., Martínez-Martínez, S., Punzón, C., Redondo, J.M., y Fresno, M. (2000).** An Essential Role of the Nuclear Factor of Activated T Cells in the Regulation of the Expression of the Cyclooxygenase-2 Gene in Human T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23627-23635.

**Jabbour, H.N., Sales, K.J., Boddy, S.C., Anderson, R.A., y Williams, A.R.W. (2005).** A Positive Feedback Loop that Regulates Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin F2 $\alpha$  Synthesis via the F-Series-Prostanoid Receptor and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway. *Endocrinology* 146, 4657-4664.

**Jacob, S., Laury-Kleintop, L., y Lanza-Jacoby, S. (2008).** The select cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduced the extent of atherosclerosis in apo E-/- mice. *J Surg Res* 146, 135-142.

**Jiang, C., Ting, A.T., y Seed, B. (1998).** PPAR-[gamma] agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82-86.

**Johnson, H.M., y Torres, B.A. (1985).** Mechanism of calcium ionophore A23187-induced priming of bone marrow-derived macrophages for tumor cell killing: relationship to priming by interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 5959-5962.

**Johnson, R.C., Chapman, S.M., Dong, Z.M., Ordovas, J.M., Mayadas, T.N., Herz, J., Hynes, R.O., Schaefer, E.J., y Wagner, D.D. (1997).** Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 99, 1037-1043.

**Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., y Tontonoz, P. (2003).** Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213-219.

**Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., et al. (2002).** Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice, pp. 7604-7609.

**Kajiya, H. (2012).** Calcium Signaling in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. In *Calcium Signaling*, M.S. Islam, ed. (Springer Netherlands), pp. 917-932.

**Kang, Y.J., Kusler, B., Otsuka, M., Hughes, M., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.-C., Akira, S., Han, J., y Jones, P.P. (2007).** Calcineurin Negatively Regulates TLR-Mediated Activation Pathways, pp. 4598-4607.

**Kang, Y.J., Wingerd, B.A., Arakawa, T., y Smith, W.L. (2006).** Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J Immunol* 177, 8111-8122.

**Kanzler, I., Liehn, E.A., Koenen, R.R., y Weber, C. (2012).** Anti-inflammatory therapeutic approaches to reduce acute atherosclerotic complications. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 37-45.

**Kiani, A., Rao, A., y Aramburu, J. (2000).** Manipulating Immune Responses with Immunosuppressive Agents that Target NFAT. *Immunity* 12, 359-372.

**Kim, Y., Moon, J.S., Lee, K.S., Park, S.Y., Cheong, J., Kang, H.S., Lee, H.Y., y Kim, H.D. (2004).** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF- $\kappa$ B activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 695-703.

**Kockx, M., Guo, D.L., Traini, M., Gaus, K., Kay, J., Wimmer-Kleikamp, S., Rentero, C., Burnett, J.R., Le Goff, W., Van Eck, M., et al. (2009).** Cyclosporin A Decreases Apolipoprotein E Secretion from Human Macrophages via a Protein Phosphatase 2B-dependent and ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)-independent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 284, 24144-24154.

**Krieger, M. (1994).** Structures and Functions of Multiligand Lipoprotein Receptors: Macrophage Scavenger Receptors and LDL Receptor-Related Protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry* 63, 601-637.

**Kruth, H.S. (2013).** Fluid-Phase Pinocytosis of LDL by Macrophages: A Novel Target to Reduce Macrophage Cholesterol Accumulation in Atherosclerotic Lesions. *Curr Pharm Des* 15, 15.

**Kuchibhotla, S., Vanegas, D., Kennedy, D.J., Guy, E., Nimako, G., Morton, R.E., y Febbraio, M. (2008).** Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovascular Research* 78, 185-196.

**Kunapuli, P., Lawson, J.A., Rokach, J., y FitzGerald, G.A. (1997).** Functional characterization of the ocular prostaglandin f2alpha (PGF2alpha) receptor. Activation by the isoprostane, 12-iso-PGF2alpha. *J Biol Chem* 272, 27147-27154.

**Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., y Freeman, M.W. (2002).** Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49982-49988.

**Lages, B., y Weiss, H.J. (1995).** Original Article: Comparison of A23187 vs Ionomycin-induced Responses and Cytosolic Calcium Increases in Aequorin-loaded Human Platelets. Evidence for Ionophore-specific Differences in Intracellular Calcium Release. *Platelets* 6, 359-365.

**Lattin, J., Zidar, D.A., Schroder, K., Kellie, S., Hume, D.A., y Sweet, M.J. (2007).** G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 82, 16-32.

**Lazarus, M., Kubata, B.K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y., y Hayaishi, O. (2002).** Biochemical Characterization of Mouse Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 and Its Colocalization with Cyclooxygenase-2 in Peritoneal Macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397, 336-341.

**Letari, O., Nicosia, S., Chiavaroli, C., Vacher, P., y Schlegel, W. (1991).** Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology* 147, 980-983.

**Li, A.C., Binder, C.J., Gutierrez, A., Brown, K.K., Plotkin, C.R., Pattison, J.W., Valledor, A.F., Davis, R.A., Willson, T.M., Witztum, J.L., et al. (2004).** Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , and  $\gamma$ . *The Journal of Clinical Investigation* 114, 1564-1576.

**Li, H., Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A., y Libby, P. (1993).** An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 13, 197-204.

**Libby, P. (2002).** Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

**Lin, C.-Y., Lee, T.-S., Chen, C.-C., Chang, C.-A., Lin, Y.-J., Hsu, Y.-P., y Ho, L.-T. (2011).** Endothelin-1 exacerbates lipid accumulation by increasing the protein degradation of the ATP-binding cassette transporter G1 in macrophages. *Journal of Cellular Physiology* 226, 2198-2205.



**Lin, J.A., Watanabe, J., Rozengurt, N., Narasimha, A., Martin, M.G., Wang, J., Braun, J., Langenbach, R., y Reddy, S.T. (2007).** Atherogenic diet causes lethal ileo-ceco-colitis in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 84, 98-107.

**Lin, W.W., Chen, B.C., Hsu, Y.W., Lee, C.M., y Shyue, S.K. (1999).** Modulation of inducible nitric oxide synthase induction by prostaglandin E2 in macrophages: distinct susceptibility in murine J774 and RAW 264.7 macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 58, 87-101.

**Linton, M.F., y Fazio, S. (2008).** Cyclooxygenase products and atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 5, 25-36.

**Liu, S., y Chen, Z.J. (2011).** Expanding role of ubiquitination in NF-[kappa]B signaling. *Cell Res* 21, 6-21.

**Lo, C.-J., y Lo, E.J. (2013).** Angiotensin II inhibits interleukin-6 mRNA expression of LPS-stimulated macrophages through down-regulating calcium signaling. *The Journal of surgical research* 181, 287-292.

**Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., Jin, L., Rakeman, A.S., Michino, M., y Rao, A. (2001).** Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15, 47-58.

**Lougheed, M., Moore, E.D.W., Scriven, D.R.L., y Steinbrecher, U.P. (1999).** Uptake of Oxidized LDL by Macrophages Differs From That of Acetyl LDL and Leads to Expansion of an Acidic Endolysosomal Compartment. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 1881-1890.

**Lusis, A.J. (2000).** Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

**Ma, H.-T., y Beaven, M. (2011).** Regulators of Ca<sup>2+</sup> Signaling in Mast Cells: Potential Targets for Treatment of Mast Cell-Related Diseases? In *Mast Cell Biology*, A. Gilfillan, and D. Metcalfe, eds. (Springer US), pp. 62-90.

**MacKenzie, K.F., Clark, K., Naqvi, S., McGuire, V.A., Nöehren, G., Kristariyanto, Y., van den Bosch, M., Mudaliar, M., McCarthy, P.C., Pattison, M.J., et al. (2013).** PGE2 Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A–SIK–CRTC3 Pathway. *The Journal of Immunology* 190, 565-577.

**Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., y Weisgraber, K.H. (1984).** Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* 25, 1277-1294.

**Mäkinen, P.I., Lappalainen, J.P., Heinonen, S.E., Leppänen, P., Lähteenvuori, M.T., Aarnio, J.V., Heikkilä, J., Turunen, M.P., y Ylä-Herttuala, S. (2010).** Silencing of either SR-A or CD36 reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice and reveals reciprocal upregulation of these receptors. *Cardiovascular Research* 88, 530-538.

**Malayev, A., y Nelson, D.J. (1995).** Extracellular pH modulates the Ca<sup>2+</sup> current activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in human macrophages. *J Membr Biol* 146, 101-111.

**Marriott, I., Bost, K.L., y Mason, M.J. (1998).** Differential kinetics for induction of interleukin-6 mRNA expression in murine peritoneal macrophages: Evidence for calcium-

dependent and independent-signalling pathways. *Journal of Cellular Physiology* 177, 232-240.

**Martinez-Gonzalez, J., y Badimon, L. (2007).** Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks. *Curr Pharm Des* 13, 2215-2227.

**Martinez-Martinez, S., y Redondo, J.M. (2004).** Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem* 11, 997-1007.

**Matsumoto, H., Naraba, H., Murakami, M., Kudo, I., Yamaki, K., Ueno, A., y Oh-ishi, S. (1997).** Concordant Induction of Prostaglandin E2Synthase with Cyclooxygenase-2 Leads to Preferred Production of Prostaglandin E2over Thromboxane and Prostaglandin D2in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Peritoneal Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230, 110-114.

**Mattila, P.S., Ullman, K.S., Fiering, S., Emmel, E.A., McCutcheon, M., Crabtree, G.R., y Herzenberg, L.A. (1990).** The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *Embo J* 9, 4425-4433.

**McAdam, B.F., Catella-Lawson, F., Mardini, I.A., Kapoor, S., Lawson, J.A., y FitzGerald, G.A. (1999).** Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 272-277.

**McAdam, B.F., Mardini, I.A., Habib, A., Burke, A., Lawson, J.A., Kapoor, S., y FitzGerald, G.A. (2000).** Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 105, 1473-1482.

**Mehta, P.K., y Griendling, K.K. (2007).** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292, C82-C97.

**Metzner, J., Popp, L., Marian, C., Schmidt, R., Manderscheid, C., Renne, C., Fisslthaler, B., Fleming, I., Busse, R., Geisslinger, G., et al. (2007).** The effects of COX-2 selective and non-selective NSAIDs on the initiation and progression of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Molecular Medicine* 85, 623-633.

**Minamitani, C., Otsuka, T., Takai, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Adachi, S., Hanai, Y., Mizutani, J., Tokuda, H., y Kozawa, O. (2008).** Involvement of Rho-kinase in prostaglandin F2 $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 291, 27-32.

**Minematsu, H., Shin, M.J., Celil Aydemir, A.B., Kim, K.-O., Nizami, S.A., Chung, G.-J., y Lee, F.Y.-I. (2011).** Nuclear presence of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 and c4 is required for Toll-like receptor-activated innate inflammatory response of monocytes/macrophages. *Cellular Signalling* 23, 1785-1793.

**Mitchell, J., y Warner, T. (2006).** COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov* 5, 75-86.



**Moghimpour Bijani, F., Vallejo, J.G., y Rezaei, N. (2012).** Toll-like Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Diseases: Challenges and Opportunities. *International Reviews of Immunology* 31, 379-395.

**Moore, K.J., Andersson, L.P., Ingalls, R.R., Monks, B.G., Li, R., Arnaout, M.A., Golenbock, D.T., y Freeman, M.W. (2000).** Divergent Response to LPS and Bacteria in CD14-Deficient Murine Macrophages. *The Journal of Immunology* 165, 4272-4280.

**Moore, K.J., Kunjathoor, V.V., Koehn, S.L., Manning, J.J., Tseng, A.A., Silver, J.M., McKee, M., y Freeman, M.W. (2005).** Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 2192-2201.

**Moore, Kathryn J., y Tabas, I. (2011).** Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355.

**Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A., et al. (1995).** Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83, 473-482.

**Morinelli, T.A., Kendall, R.T., Luttrell, L.M., Walker, L.P., y Ullian, M.E. (2009).** Angiotensin II-Induced Cyclooxygenase 2 Expression in Rat Aorta Vascular Smooth Muscle Cells Does Not Require Heterotrimeric G Protein Activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330, 118-124.

**Morita, I. (2002).** Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 69, 165-175.

**Mosser, D.M. (2003).** The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* 73, 209-212.

**Müller, M.R., y Rao, A. (2010).** NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10, 645-656.

**Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh-ishi, S., et al. (2000).** Regulation of Prostaglandin E2 Biosynthesis by Inducible Membrane-associated Prostaglandin E2 Synthase That Acts in Concert with Cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32783-32792.

**Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., y Ross, R. (1994).** ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14, 133-140.

**Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J.-i., Nakagawa, T., Tamura, R., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., et al. (1999).** CD36, a Novel Receptor for Oxidized Low-Density Lipoproteins, Is Highly Expressed on Lipid-Laden Macrophages in Human Atherosclerotic Aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 1333-1339.

**Narasimha, A., Watanabe, J., Lin, J.A., Hama, S., Langenbach, R., Navab, M., Fogelman, A.M., y Reddy, S.T. (2007).** A novel anti-atherogenic role for COX-2--potential mechanism for the cardiovascular side effects of COX-2 inhibitors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84, 24-33.

**Narasimha, A.J., Watanabe, J., Ishikawa, T.-o., Priceman, S.J., Wu, L., Herschman, H.R., y Reddy, S.T. (2010).** Absence of Myeloid COX-2 Attenuates Acute Inflammation but Does Not Influence Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Null Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 260-268.

**Narumiya, S., y FitzGerald, G.A. (2001).** Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 25-30.

**Nataraj, C., Thomas, D.W., Tilley, S.L., Nguyen, M., Mannon, R., Koller, B.H., y Coffman, T.M. (2001).** Receptors for prostaglandin E2 that regulate cellular immune responses in the mouse. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 1229-1235.

**Nathan, C. (1991).** Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt* 88, 200-207.

**Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., et al. (1996).** The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak: A Review Based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16, 831-842.

**Navab, M., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., y Fogelman, A.M. (2011).** HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 8, 222-232.

**Neer, E.J. (1995).** Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.

**Neuschäfer-Rube, F., Engemaier, E., Koch, S., Böer, U., y Püschel, G.P. (2003).** Identification by site-directed mutagenesis of amino acids contributing to ligand-binding specificity or signal transduction properties of the human FP prostanoid receptor. *Biochem J* 371, 443-449.

**Northrop, J.P., Ho, S.N., Chen, L., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Nolan, G.P., Admon, A., y Crabtree, G.R. (1994).** NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497-502.

**Obasanjo-Blackshire, K., Mesquita, R., Jabr, R.I., Molkentin, J.D., Hart, S.L., Marber, M.S., Xia, Y., y Heads, R.J. (2006).** Calcineurin regulates NFAT-dependent iNOS expression and protection of cardiomyocytes: Co-operation with Src tyrosine kinase, pp. 672-683.

**Oeckinghaus, A., y Ghosh, S. (2009).** The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1.

**Olesen, M., Kwong, E., Meztli, A., Kontny, F., Seljeflot, I., Arnesen, H., Lyngdorf, L., y Falk, E. (2002).** No Effect of Cyclooxygenase Inhibition on Plaque Size in Atherosclerosis-prone Mice. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 36, 362-367.

**Onozaki, K., Takenawa, T., Homma, Y., y Hashimoto, T. (1983).** The mechanism of macrophage activation induced by Ca<sup>2+</sup> ionophore. *Cellular Immunology* 75, 242-254.

**Oram, J.F., y Vaughan, A.M. (2006).** ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease. *Circulation Research* 99, 1031-1043.

**Ortega-Gómez, A., Perretti, M., y Soehnlein, O. (2013).** Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine* 5, 661-674.

**Packard, R.S., Lichtman, A., y Libby, P. (2009).** Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Seminars in Immunopathology* 31, 5-22.

**Panzer, U., y Uguccioni, M. (2004).** Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *European Journal of Immunology* 34, 3682-3689.

**Paramo, J.A., Rodriguez, J.A., Belouqui, O., y Orbe, J. (2005).** Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5, 303-311.

**Patrignani, P., Filabozzi, P., y Patrono, C. (1982).** Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 69, 1366-1372.

**Pavlovic, S., Du, B., Sakamoto, K., Khan, K.M.F., Natarajan, C., Breyer, R.M., Dannenberg, A.J., y Falcone, D.J. (2006).** Targeting Prostaglandin E2 Receptors as an Alternative Strategy to Block Cyclooxygenase-2-dependent Extracellular Matrix-induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression by Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 281, 3321-3328.

**Pello, O.M., Silvestre, C., De Pizzol, M., y Andrés, V. (2011).** A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 216, 1172-1176.

**Perkins, N.D. (2007).** Integrating cell-signalling pathways with NF-[kappa]B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62.

**Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M., y Maeda, N. (1992).** Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 4471-4475.

**Praticò, D., Tillmann, C., Zhang, Z.-B., Li, H., y FitzGerald, G.A. (2001).** Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 3358-3363.

**Pratt, P.F., Bokemeyer, D., Foschi, M., Sorokin, A., y Dunn, M.J. (2003).** Alterations in Subcellular Localization of p38 MAPK Potentiates Endothelin-stimulated COX-2 Expression in Glomerular Mesangial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 51928-51936.

**Qiao, J.H., Tripathi, J., Mishra, N.K., Cai, Y., Tripathi, S., Wang, X.P., Imes, S., Fishbein, M.C., Clinton, S.K., Libby, P., et al. (1997).** Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 150, 1687-1699.

**Raddassi, K., Berthon, B., Petit, J.-F., y Lemaire, G. (1994).** Role of Calcium in the Activation of Mouse Peritoneal Macrophages: Induction of NO Synthase by Calcium Ionophores and Thapsigargin. *Cellular Immunology* 153, 443-455.

**Rao, A., Luo, C., y Hogan, P.G. (1997).** TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annual Review of Immunology* 15, 707-747.

**Repa, J.J., y Mangelsdorf, D.J. (2002).** The liver X receptor gene team: Potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* 8, 1243-1248.

**Rhee, S.H., y Hwang, D. (2000).** Murine TOLL-like Receptor 4 Confers Lipopolysaccharide Responsiveness as Determined by Activation of NF $\kappa$ B and Expression of the Inducible Cyclooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34035-34040.

**Ricciotti, E., y FitzGerald, G.A. (2011).** Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 986-1000.

**Rott, D., Zhu, J., Burnett, M.S., Zhou, Y.i.F.u., Zalles-Ganley, A., Ogunmakinwa, J., y Epstein, S.E. (2003).** Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice. *Journal of the American College of Cardiology* 41, 1812-1819.

**Sakamoto, K., Kamimura, M., Kurozumi, S., y Ito, S. (1995).** Prostaglandin F2 alpha receptor. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12, 405-411.

**Sales, K.J., Maldonado-Pérez, D., Grant, V., Catalano, R.D., Wilson, M.R., Brown, P., Williams, A.R.W., Anderson, R.A., Thompson, E.A., y Jabbour, H.N. (2009).** Prostaglandin F2 $\alpha$ -F-prostanoid receptor regulates CXCL8 expression in endometrial adenocarcinoma cells via the calcium-calcineurin-NFAT pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 1917-1928.

**Samuelsson, B., Morgenstern, R., y Jakobsson, P.-J. (2007).** Membrane Prostaglandin E Synthase-1: A Novel Therapeutic Target. *Pharmacological Reviews* 59, 207-224.

**San-Antonio, B., Íñiguez, M.A., y Fresno, M. (2002).** Protein Kinase C $\zeta$  Phosphorylates Nuclear Factor of Activated T Cells and Regulates Its Transactivating Activity. *Journal of Biological Chemistry* 277, 27073-27080.

**Sattayaprasert, P., Choi, H., Chongthammakun, S., y McLarnon, J. (2005).** Platelet-activating factor enhancement of calcium influx and interleukin-6 expression, but not production, in human microglia. *Journal of Neuroinflammation* 2, 11.

**Scharenberg, A.M., Humphries, L.A., y Rawlings, D.J. (2007).** Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* 7, 778-789.

**Schönbeck, U., Sukhova, G.K., Graber, P., Coulter, S., y Libby, P. (1999).** Augmented Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Atherosclerotic Lesions. *The American journal of pathology* 155, 1281-1291.

**Schreiber, S.L., y Crabtree, G.R. (1992).** The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* 13, 136-142.

**Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R.Y., Herman, A.G., y Martinet, W. (2007).** Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovascular Research* 73, 470-480.

**Schulz, R.A., y Yutzey, K.E. (2004).** Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Developmental Biology* 266, 1-16.

**Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Avots, A., Chuvpilo, S., Klein-Hessling, S., Jha, M.K., Kondo, E., Pagel, P., Schulze-Luehrmann, J., y Palmetshofer, A. (2004).** NFAT and NF- $\kappa$ B factors—the distant relatives. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1166-1170.

**Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., y Uchida, K. (2002).** 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 : A PROSTAGLANDIN D2 METABOLITE GENERATED DURING INFLAMMATORY PROCESSES. *Journal of Biological Chemistry* 277, 10459-10466.

**Shumilina, E., Huber, S.M., y Lang, F. (2011).** Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of dendritic cell functions. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300, C1205-C1214.

**Slice, L.W., Chiu, T., y Rozengurt, E. (2005).** Angiotensin II and Epidermal Growth Factor Induce Cyclooxygenase-2 Expression in Intestinal Epithelial Cells through Small GTPases Using Distinct Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 280, 1582-1593.

**Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., y Miyata, M. (1995).** Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8264-8268.

**Smith, W.L., y Song, I. (2002).** The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 69, 115-128.

**Smyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., y FitzGerald, G.A. (2009).** Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research* 50, S423-S428.

**Solomon, S.D., McMurray, J.J.V., Pfeffer, M.A., Wittes, J., Fowler, R., Finn, P., Anderson, W.F., Zaubler, A., Hawk, E., y Bertagnolli, M. (2005).** Cardiovascular Risk Associated with Celecoxib in a Clinical Trial for Colorectal Adenoma Prevention. *New England Journal of Medicine* 352, 1071-1080.

**Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., y Witztum, J.L. (1989).** Beyond Cholesterol. *New England Journal of Medicine* 320, 915-924.

**Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.-H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G., y Glass, C.K. (2000).** 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4844-4849.

**Straus, D.S., y Glass, C.K. (2001).** Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. *Medicinal Research Reviews* 21, 185-210.

**Takeuchi, O., y Akira, S. (2010).** Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805-820.

**Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., y Wang, N. (2008).** HDL, ABC Transporters, and Cholesterol Efflux: Implications for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell metabolism* 7, 365-375.

**Tanabe, T., y Tohnai, N. (2002).** Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68–69, 95-114.

**Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., y Kudo, I. (2000).** Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E2 Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32775-32782.

**Tedgui, A., y Mallat, Z. (2006).** Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological Reviews* 86, 515-581.

**The Emerging Risk Factors, C. (2009).** Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 302, 1993-2000.

**Tilley, S.L., Coffman, T.M., y Koller, B.H. (2001).** Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 15-23.

**Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G.A., Thomazy, V.A., y Evans, R.M. (1998).** PPAR $\alpha$  Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell* 93, 241-252.

**Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., y Margioris, A.N. (2006).** Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 1654-1661.

**Valeyev, N., Bates, D., Heslop-Harrison, P., Postlethwaite, I., y Kotov, N. (2008).** Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Systems Biology* 2, 48.

**Vane, J.R., Bakhle, Y.S., y Botting, R.M. (1998).** CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38, 97-120.

**Vega, A., Chacón, P., Monteseirín, J., El Bekay, R., Alba, G., Martín-Nieto, J., y Sobrino, F. (2007).** Expression of the transcription factor NFAT2 in human neutrophils: IgE-dependent, Ca $^{2+}$ - and calcineurin-mediated NFAT2 activation. *Journal of Cell Science* 120, 2328-2337.

**Vig, M., y Kinet, J.-P. (2009).** Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol* 10, 21-27.

**Vila, L. (2004).** Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: Role in atherosclerosis. *Medicinal Research Reviews* 24, 399-424.

**Vila-del Sol, V., y Fresno, M. (2005).** Involvement of TNF and NF $\kappa$ B in the Transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Expression by IFN $\gamma$  in Macrophages, pp. 2825-2833.

**Vogel, C., Boerboom, A.-M.J.F., Baechle, C., El-Bahay, C., Kahl, R., Degen, G.H., y Abel, J. (2000).** Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway. *Carcinogenesis* 21, 2267-2274.



- Wadleigh, D.J., Reddy, S.T., Kopp, E., Ghosh, S., y Herschman, H.R. (2000).** Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 275, 6259-6266.
- Wang, E., Taylor, R.W., y Pfeiffer, D.R. (1998).** Mechanism and Specificity of Lanthanide Series Cation Transport by Ionophores A23187, 4-BrA23187, and Ionomycin. *Biophysical Journal* 75, 1244-1254.
- Wang, M., Ihida-Stansbury, K., Kothapalli, D., Tamby, M.C., Yu, Z., Chen, L., Grant, G., Cheng, Y., Lawson, J.A., Assoian, R.K., et al. (2011).** Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 Modulates the Response to Vascular Injury. *Circulation* 123, 631-639.
- Wang, M., Song, W.L., Cheng, Y., y Fitzgerald, G.A. (2008).** Microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibition in cardiovascular inflammatory disease. *J Intern Med* 263, 500-505.
- Wang, M., Zukas, A.M., Hui, Y., Ricciotti, E., Puré, E., y FitzGerald, G.A. (2006).** Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 14507-14512.
- Ward, C., Dransfield, I., Murray, J., Farrow, S.N., Haslett, C., y Rossi, A.G. (2002).** Prostaglandin D2 and Its Metabolites Induce Caspase-Dependent Granulocyte Apoptosis That Is Mediated Via Inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation Using a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ -Independent Mechanism. *The Journal of Immunology* 168, 6232-6243.
- Warner, T.D., y Mitchell, J.A. (2004).** Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB Journal* 18, 790-804.
- Watanabe, J., Lin, J.A., Narasimha, A.J., Shahbazian, A., Ishikawa, T.-o., Martin, M.G., Herschman, H.R., y Reddy, S.T. (2010).** Novel anti-inflammatory functions for endothelial and myeloid cyclooxygenase-2 in a new mouse model of Crohn's disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, G842-G850.
- West, M.A., Clair, L., y Bellingham, J. (1996).** Role of Calcium in Lipopolysaccharide-Stimulated Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Signal Transduction in Naive and Endotoxin-Tolerant Murine Macrophages. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 41, 647-652.
- Wettschureck, N., y Offermanns, S. (2005).** Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews* 85, 1159-1204.
- Yarilina, A., Xu, K., Chen, J., y Ivashkiv, L.B. (2011).** TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 1573-1578.
- Ye, D., Lammers, B., Zhao, Y., Meurs, I., Van Berkel, T.J., y Van Eck, M. (2011).** ATP-binding cassette transporters A1 and G1, HDL metabolism, cholesterol efflux, and inflammation: important targets for the treatment of atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 12, 647-660.
- Ye, D., Meurs, I., Ohigashi, M., Calpe-Berdiel, L., Habets, K.L.L., Zhao, Y., Kubo, Y., Yamaguchi, A., Van Berkel, T.J.C., Nishi, T., et al. (2010).** Macrophage ABCA5 deficiency influences cellular cholesterol efflux and increases susceptibility to

atherosclerosis in female LDLr knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395, 387-394.

**Yu, Y., Ricciotti, E., Grosser, T., y Fitzgerald, G.A. (2009).** The translational therapeutics of prostaglandin inhibition in atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, 222-226.

**Yu, Z., Crichton, I., Tang, S.Y., Hui, Y., Ricciotti, E., Levin, M.D., Lawson, J.A., Puré, E., y FitzGerald, G.A. (2012).** Disruption of the 5-lipoxygenase pathway attenuates atherogenesis consequent to COX-2 deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6727-6732.

**Zanoni, I., Ostuni, R., Barresi, S., Gioia, M.D., Broggi, A., Costa, B., Marzi, R., y Granucci, F. (2012).** CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 122, 1747-1757.

**Zanoni, I., Ostuni, R., Capuano, G., Collini, M., Caccia, M., Ronchi, A.E., Rocchetti, M., Mingozi, F., Foti, M., Chirico, G., et al. (2009).** CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460, 264-268.

**Zanoni, I., y Granucci, F. (2012).** Regulation and dysregulation of innate immunity by NFAT signaling downstream of pattern recognition receptors (PRRs). *European Journal of Immunology* 42, 1924-1931.

**Zhang, W., y Wei, Q. (2011).** Calcineurin stimulates the expression of inflammatory factors in RAW 264.7 cells by interacting with proteasome subunit alpha type 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407, 668-673.

**Zhao, Y., Chen, X., Yang, H., Zhou, L., Okoro, E.U., y Guo, Z. (2011).** A Novel Function of Apolipoprotein E: Upregulation of ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression. *PLoS ONE* 6, e21453.



## Material Suplementario.

Actb-Mm00607939_s1	Relb-Mm00485672_m1	Cd80-Mm00711660_m1
LOC14433-Mm99999915_g1	Irf2-Mm00515204_m1	Il6-Mm00446190_m1
Prkci-Mm00435769_m1	Ikbkg-Mm00494927_m1	Ccl3-Mm00441258_m1
Gpr44-Mm00438315_s1	Nfatc4-Mm00452375_m1	Nfkbib-Mm00456849_m1
Itgal-Mm00801807_m1	Cd28-Mm00483137_m1	Ikbkb-Mm00833995_m1
Tnfrsf6-Mm00433237_m1	Icsbp1-Mm00492567_m1	Cd34-Mm00519283_m1
Oat-Mm00497544_m1	Nfkb2-Mm00479807_m1	Il12b-Mm00434170_m1
Arg2-Mm00477592_m1	Bax-Mm00432050_m1	Ptger4-Mm00436053_m1
Nfkb1-Mm00476361_m1	Cd86-Mm00444543_m1	Vegfa-Mm00437304_m1
Ifng-Mm00801778_m1	Il4-Mm00445259_m1	Slc7a2-Mm00432032_m1
18S-4342379-18S	Ptgs2-Mm00478374_m1	Csf1-Mm00432688_m1
Ptgdr-Mm00436050_m1	Ptger3-Mm00441045_m1	Il17-Mm00439619_m1
Il12a-Mm00434165_m1	Ptger1-Mm00443097_m1	Prkca-Mm00440855_m1
Il10-Mm00439616_m1	Lta-Mm00440227_m1	Cxcl12-Mm00445552_m1
Rela-Mm00501346_m1	Ptgfr-Mm00436055_m1	Prkcd-Mm00440891_m1
Ptgds2-Mm00479846_m1	Ikbke-Mm00444862_m1	Otc-Mm00493267_m1
Nfatc2-Mm00477776_m1	Il5-Mm00439646_m1	Ptgs1-Mm00477214_m1
Ptger2-Mm00436051_m1	Cd4-Mm00442754_m1	Nfkbie-Mm00500796_m1
Il2ra-Mm00434261_m1	Tfrc-Mm00441941_m1	Ass1-Mm00711256_m1
Fos-Mm00487425_m1	Srm-Mm00726089_s1	Ptgis-Mm00447271_m1
Slc7a1-Mm00432019_m1	Nfat5-Mm00467257_m1	Il1b-Mm00434228_m1
Il7-Mm00434291_m1	Ptgir-Mm00801938_m1	Jun-Mm00495062_s1
Tbxas1-Mm00495553_m1	Prkcq-Mm00435796_m1	Rel-Mm00485657_m1
Irf1-Mm00515191_m1	Il13-Mm00434204_m1	Nos2-Mm00440485_m1
Sms-Mm00786246_s1	Ptges-Mm00452105_m1	Cd14-Mm00438094_g1
Map3k14-Mm00444166_m1	Nfatc1-Mm00479445_m1	Tnfrsf6-Mm00438864_m1
Cd3e-Mm00599683_m1	Ddah2-Mm00516768_m1	Il15-Mm00434210_m1
Tnf-Mm00443258_m1	Il2-Mm00434256_m1	Il1a-Mm00439620_m1
Prkcz-Mm00776345_g1	Bcl2-Mm00477631_m1	Arg1-Mm00475988_m1
Icam1-Mm00516023_m1	Tbxa2r-Mm00436916_m1	Chuk-Mm00432529_m1
Cd8b-Mm00438116_m1	Cd19-Mm00515420_m1	Nfkbia-Mm00477798_m1
Map3k8-Mm00432637_m1	Ltb-Mm00434774_g1	
	Ptges2-Mm00460181_m1	

---

**Figura Suplementaria 1. Lista de los 96 genes analizados mediante *array* de *RT-PCR*.**

---

**Figura Suplementaria 2. Análisis de expresión de 96 genes mediante array de RT-PCR.**

Las células RAW 264.7 fueron tratadas con LPS (2 µg/ml), Ion (0,5 µM), Ion+LPS (0,5 µM + 2 µg/ml), CsA (1 µg/ml) + Ion y CsA + Ion. + LPS durante 18h. Se muestra el mapa de densidad de la expresión relativa de los diferentes genes. Se analizaron triplicados de cada muestra y los resultados se normalizaron respecto a la expresión del endógeno β-actina y al grupo control. Se eliminaron aquellos genes cuyas Ct estaban por encima de 40. En rojo se muestran los valores que estaban por encima de los obtenidos para las muestras control, en verde los que eran menores y en negro los que no sufrieron variaciones respecto al control. Datos analizados mediante el *RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis version 3.5*.

